



# Contrôle de la matière organique biodégradable au cours des traitements d'oxydation et de la distribution des eaux d'alimentation

Christian Volk

## ► To cite this version:

Christian Volk. Contrôle de la matière organique biodégradable au cours des traitements d'oxydation et de la distribution des eaux d'alimentation. Hydrologie. Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 1994. Français. NNT : . tel-00529964

**HAL Id: tel-00529964**

**<https://theses.hal.science/tel-00529964>**

Submitted on 27 Oct 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

X

# **Doctorat de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées**

**Spécialité: Sciences et Techniques de l'Environnement**

**Christian VOLK**

Ingénieur de l'ENITA-Dijon

**Contrôle de la matière organique biodégradable au  
cours des traitements d'oxydation et de la distribution  
des eaux d'alimentation**

**Soutenue le 01 / 04 / 1994**

## **Composition du jury**

|                           |                       |  |
|---------------------------|-----------------------|--|
| <b>Président</b>          | <i>D. Thévenot</i>    | <b>Université de Paris XII</b>                     |
| <b>Rapporteurs</b>        | <i>J.C. Block</i>     | <b>Faculté de Pharmacie - Nancy</b>                |
|                           | <i>N. Merlet</i>      | <b>ESIP-Université de Poitiers</b>                 |
|                           | <i>L.A. Kaplan</i>    | <b>Stroud Water Research Center - Philadelphie</b> |
| <b>Examineur</b>          | <i>M.M. Bourbigot</i> | <b>Compagnie Générale des Eaux</b>                 |
| <b>Directeur de thèse</b> | <i>J.C. Joret</i>     | <b>Anjou Recherche</b>                             |



## Résumé

La mesure de la matière organique biodégradable (MOB) présente un réel intérêt pour le suivi de l'efficacité des filières de traitement et la maîtrise de la reviviscence bactérienne dans les réseaux de distribution. Elle est réalisée à l'aide de tests biologiques basés sur l'inoculation d'échantillons d'eau par des micro-organismes. Une étude méthodologique portant sur la signification de la mesure du carbone organique dissous biodégradable (CODB) et la comparaison de différentes techniques d'évaluation de la MOB a montré que:

- pour une technique donnée, la valeur de CODB mesurée dépendait des conditions expérimentales appliquées (i.e. quantité d'inoculum, aération, durée d'incubation).
- les résultats de mesure du CODB étaient différents selon que l'on utilisait un inoculum fixé ou en suspension, cependant les valeurs obtenues par les deux méthodes étaient bien corrélées.
- la comparaison des valeurs de CODB et de COA a conduit dans 60% des cas à des résultats concordant, avec une équivalence de 90-140  $\mu\text{g C eq. acétate/ mg de CODB}$ .
- le CODB a prédit à 90% le potentiel de recroissance d'une flore naturelle mixte avec un rendement de croissance de  $1,7 \times 10^9$  cellules/ mg de CODB.

Au cours des traitements d'oxydation par l'ozone seul ou couplé au peroxyde d'hydrogène (0,45 g  $\text{H}_2\text{O}_2$  / g  $\text{O}_3$ ) ou à un catalyseur d'oxyde de titane, l'optimum de formation de CODB a été obtenu pour des taux de traitement intermédiaires (0,5 -1 mg  $\text{O}_3$ / mg COD) et pour des temps de contacts courts (5 -10 min.). L'oxydation catalytique a conduit à une augmentation modérée de CODB par suite d'une minéralisation plus poussée des composés organiques.

Des observations de terrain menées sur un réseau de distribution ont montré que la recroissance bactérienne était gouvernée par trois paramètres clés qui sont la température de l'eau, la concentration en résiduel de chlore et la teneur en matière organique biodégradable. Il a été possible de prédire la qualité bactériologique de l'eau et la consommation de CODB le long du réseau grâce à des modèles de régression linéaire multiple, intégrant respectivement les paramètres température - résiduel de chlore et température - concentration de CODB dans l'eau en sortie d'usine de potabilisation.

La reviviscence bactérienne s'est accompagnée de l'apparition de coliformes sur certains sites du réseau de distribution. L'observation de ces germes a été associée le plus fréquemment à des températures de l'eau supérieures à 15°C, à des consommations de CODB supérieures à 0,15 mg/l, à des logarithmes de dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence supérieurs à 5,2 et à des résiduels de chlore inférieurs à 0,10 mg/l. Il a été possible de graduer le risque d'apparition des coliformes par comptabilisation des dépassements de seuils critiques pour ces quatre paramètres, correspondant à des fréquences croissantes d'isolement de ces germes dans le réseau. Ce modèle de risque (AL COL) peut s'avérer un outil efficace dans la maîtrise de la qualité bactériologique le long des réseaux de distribution. En effet, tout réseau présentant des risques élevés devrait faire l'objet de mesures immédiates de chloration afin de réduire ces risques et éviter l'apparition des coliformes.



## **Mots clés**

**Matière organique biodégradable- Carbone organique dissous biodégradable (CODB) - Carbone organique assimilable (COA) - Oxydation- Ozotest - Ozone - Peroxyde d'hydrogène- Ozone catalytique - Réseau de distribution - Recroissance bactérienne - Coliformes - Température - Résiduel de chlore - Modèle d'alerte.**

## **Avant-propos**

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat CIFRE au Laboratoire de Microbiologie d'Anjou Recherche, Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux.

Je remercie toutes les personnes qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à l'élaboration de cette thèse, pour leurs conseils scientifiques et techniques, pour leur aide dans la réalisation des études, dans la correction et la soumission pour publication des différents projets d'articles et pour avoir accepté de juger ce présent travail, ainsi que ma femme.



# **Contrôle de la matière organique biodégradable au cours des traitements d'oxydation et de la distribution des eaux d'alimentation**

## **SOMMAIRE**

|   |          |
|---|----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>1</b> |
| <b>CHAPITRE I - MESURE DE LA MATIERE ORGANIQUE BIODEGRADABLE DES EAUX (Etude méthodologique).</b>   | <b>5</b> |
| Les différentes méthodes de mesure de la matière organique biodégradable des eaux.  | 6        |
| Méthode de mesure du CODB utilisant un inoculum bactérien fixé sur du sable.  | 9        |
| Situation du problème et objectifs de l'étude.  | 12       |
| Références bibliographiques.  | 14       |
| <br>I) Effet des conditions expérimentales sur la valeur de CODB mesurée à l'aide d'un inoculum bactérien mixte fixé ou en suspension et comparaison des teneurs en CODB déterminées par ces deux méthodes. | <br>16   |
| <br><i>"Comparison of two techniques for measuring biodegradable dissolved organic carbon in water"</i>   | <br>16   |
| 1) Introduction.  | 18       |
| 1.1) BDOC determination using suspended bacteria.   | 18       |
| 1.2) BDOC determination using bacteria fixed on sand.   | 19       |
| 2) Materials and methods.   | 19       |
| 2.1) BDOC determination using bacteria fixed on sand.   | 20       |
| 2.2) BDOC determination using suspended bacteria.   | 21       |
| 2.3) Epifluorescent counts.   | 21       |
| 3) Results and discussion.  | 22       |
| 3.1) BDOC determination using bacteria fixed on sand.   | 22       |
| 3.1.1) Effect of the inoculum size.   | 22       |
| 3.1.2) Effect of the incubation period.   | 24       |
| 3.1.3) Effect of aeration conditions.   | 24       |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2) BDOC determination using suspended bacteria.  | 28        |
| 3.2.1) Effect of the inoculum size.  | 28        |
| 3.2.2) Effect of the incubation period.  | 28        |
| 3.2.3) Effect of aeration.   | 29        |
| 3.3) Comparison of BDOC values obtained with suspended or sand fixed bacteria.   | 30        |
| 4) Conclusion.   | 34        |
| 5) References.   | 34        |
| <br><b>II) Signification de la mesure du CODB: relation entre CODB et croissance de souches bactériennes pures et d'une flore naturelle mixte.</b> | <br>37    |
| <b><i>" La mesure du CODB: un index du potentiel de reviviscence bactérienne des eaux. "</i></b>   | <b>37</b> |
| 1) Introduction.   | 39        |
| 2) Matériel et méthodes.   | 42        |
| 2.1) Préparation de la verrerie.   | 42        |
| 2.2) Préparation des cultures de <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 et <i>Spirillum</i> NOX.   | 42        |
| 2.3) Suivi de la croissance bactérienne de <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17.   | 42        |
| 2.4) Suivi de la croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 + <i>Spirillum</i> NOX.  | 42        |
| 2.5) Suivi de la croissance d'une flore mixte.   | 43        |
| 2.6) Mesure du CODB en présence de bactéries fixées sur du sable.  | 43        |
| 3) Résultats et discussion.  | 44        |
| 3.1) Relation entre CODB et maximum de croissance d'une souche pure de <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17.   | 44        |
| 3.2) Relation entre le CODB, la croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 et <i>Spirillum</i> NOX et le COA.                                | 46        |
| 3.3) Relation entre CODB et recroissance d'une flore bactérienne mixte.  | 49        |
| 4) Conclusion.   | 49        |
| 5) Références bibliographiques.  | 52        |
| <br><b>CHAPITRE II - EFFET DE L'OXYDATION SUR LA PRODUCTION DE CODB (étude de laboratoire).</b>  | <br>54    |
| <b>Situation du problème et objectifs de l'étude.</b>  | <b>55</b> |
| <b>Références bibliographiques.</b>  | <b>57</b> |

|   |               |
|---|---------------|
| <b>I) L'ozone.</b>  | <b>59</b>     |
| <i>"Effect of ozone on the production of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) during water treatment."</i> | <b>59</b>     |
| 1) Introduction.  | <b>61</b>     |
| 2) Materials and methods.   | <b>64</b>     |
| 2.1) Origin and characteristics of water samples studied.   | <b>64</b>     |
| 2.2) Ozone production.  | <b>65</b>     |
| 2.3) Oxidation test with ozone.   | <b>65</b>     |
| 2.4) Measurements.  | <b>66</b>     |
| 3) Results and discussion.  | <b>66</b>     |
| 3.1) Effects of the applied ozone dose.   | <b>67</b>     |
| 3.2) Effect of contact time.  | <b>71</b>     |
| 3.3) Effect of applied ozone dose - contact time (CT) combination.  | <b>73</b>     |
| 4) Conclusion.  | <b>78</b>     |
| 5) References.  | <b>80</b>     |
| <br><b>II) Le couplage ozone peroxyde d'hydrogène.</b>  | <br><b>82</b> |
| <i>"Effect of ozone-hydrogen peroxide combination on the formation of biodegradable dissolved organic carbon."</i>  | <b>82</b>     |
| 1) Introduction.  | <b>84</b>     |
| 2) Materials and methods.   | <b>86</b>     |
| 2.1) Characteristics of water samples studied.  | <b>86</b>     |
| 2.2) Ozone production.  | <b>86</b>     |
| 2.3) Oxidation test with ozone and ozone/hydrogen peroxide.   | <b>87</b>     |
| 2.4) Measurements.  | <b>87</b>     |
| 3) Results and discussion.  | <b>88</b>     |
| 3.1) Effects of hydrogen peroxide/ozone ratio.  | <b>88</b>     |
| 3.2) Effect of ozone dose at a constant hydrogen peroxide/ ozone ratio.   | <b>92</b>     |
| 3.3) Effect of contact time.  | <b>96</b>     |
| 4) Conclusion.  | <b>98</b>     |
| 5) References.  | <b>99</b>     |

|   |            |
|---|------------|
| <b>III) L'ozone catalytique.</b>  | <b>101</b> |
| <i>"Comparison of the effect of ozone, ozone hydrogen peroxide system and catalytic ozone on the biodegradable organic matter of a fulvic acid solution."</i> | <b>101</b> |
| 1) Introduction.  | <b>102</b> |
| 2) Materials and methods.   | <b>104</b> |
| 3) Results and discussion.  | <b>105</b> |
| 4) Conclusions.   | <b>111</b> |
| 5) References.  | <b>112</b> |

## **CHAPITRE III - CODB ET RECROISSANCE BACTERIENNE LE LONG D'UN RESEAU DE DISTRIBUTION (étude de terrain).**

**114**

**Situation du problème et objectifs de l'étude.** **115**

**Références bibliographiques** **117**

**I) "Evolution de la qualité bactériologique et de la teneur en matière organique biodégradable le long d'un réseau de distribution."** **119**

|  |            |
|--|------------|
| 1) Introduction  | <b>122</b> |
| 2) Matériels et méthodes.  | <b>124</b> |
| 2.1) Réseau de distribution étudié.  | <b>124</b> |
| 2.2) Paramètres bactériologiques.  | <b>126</b> |
| 2.2.1) Dénombrements microscopiques en épifluorescence (EPI).                                | <b>126</b> |
| 2.2.2) Dénombrement de la flore hétérotrophe aérobie mésophile cultivable sur milieu gélosé. | <b>126</b> |
| 2.2.3) Dénombrement des coliformes.  | <b>126</b> |
| 2.3) Mesure du CODB.   | <b>127</b> |
| 2.4) Paramètres physico-chimiques.   | <b>127</b> |
| 3) Résultats.  | <b>127</b> |
| 3.1) Apparition des coliformes.  | <b>128</b> |
| 3.2) Variation de la flore bactérienne en suspension dans l'eau.                             | <b>130</b> |
| 3.3) Variation de la consommation de CODB le long du réseau de distribution.                 | <b>133</b> |
| 4) Discussion.   | <b>137</b> |
| 5) Références.   | <b>141</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>II) "Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation."</b>                                  | <b>146</b> |
| 1) Introduction.  | 150        |
| 2) Matériels et méthodes.   | 152        |
| 2.1) Réseaux de distribution étudiés.   | 152        |
| 2.2) Paramètres bactériologiques.   | 154        |
| 2.2.1) Dénombrements microscopiques en épifluorescence (EPI).   | 154        |
| 2.2.2) Dénombrement des coliformes.   | 155        |
| 2.3) Mesure du carbone organique dissous biodégradable (CODB) et calcul de la consommation de CODB entre l'usine de traitement et un site de prélèvement. | 155        |
| 2.4) Paramètres physico-chimiques.  | 155        |
| 3) Résultats et discussion.   | 156        |
| 3.1) Elaboration du modèle "Alerte coliformes" (AL COL):détermination du risque d'apparition des coliformes sur un site donné.                            | 156        |
| 3.2) Application du modèle AL COL lors du suivi de deux réseaux de distribution.  | 165        |
| 3.2.1) Risque d'apparition des coliformes sur un site donné.  | 165        |
| 3.2.2) Maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau (cas du réseau 2).   | 168        |
| 3.3) Elaboration du modèle de risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites.  | 169        |
| 4) Conclusions  | 172        |
| 5) Références.  | 174        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b> | <b>177</b> |
|--|------------|





# Introduction

Afin de faire face à l'augmentation des besoins en eau potable, les eaux de surface sont de plus en plus utilisées pour la production d'eau de boisson. Ces eaux de surface sont naturellement constituées de composés minéraux et organiques ainsi que d'éléments vivants (micro-organismes, animaux et végétaux). Outre ces constituants, viennent s'ajouter des pollutions urbaines (rejets de stations d'épuration), industrielles (polluants organiques ou inorganiques) ou agricoles (engrais, produits phytosanitaires). Du fait de la présence de ces éléments indésirables, une eau de surface doit subir un traitement préalable avant sa consommation. Ce traitement doit fournir une eau dite potable, c'est à dire conforme à des normes en vigueur. Ces dispositions réglementaires s'appliquent à différents paramètres organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques ainsi qu'à la présence de substances indésirables et toxiques.

Les traitements de l'eau ont initialement fait appel à l'usage du chlore en tant qu'agent oxydant et désinfectant, par la suite il a été associé à diverses phases de traitement (floculation, coagulation, décantation et filtration). Même si le rôle bénéfique du chlore est incontestable (traitement des goûts, odeurs et couleurs, élimination de composés minéraux comme l'ammoniac, prévention de la croissance algale et bactérienne dans les unités de traitement et dans les réseaux de distribution) et son coût restreint, son utilisation a été remise en cause lors de la mise en évidence de la formation de trihalométhanes (THM) aux propriétés mutagènes, par réaction avec la matière organique de l'eau. La présence de matière organique dans l'eau cause de nombreux problèmes, entre autres, elle est à l'origine de colorations, de goûts, d'odeurs, et de la consommation de chlore s'accompagnant de la formation de THM. Sa fraction biodégradable est, par ailleurs, responsable de la recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution. Les traitements biologiques (dans lesquels la suppression de la pré-chloration a permis le développement et l'activité de micro-organismes dans les filtres) ont été développés afin de réduire la quantité de matière organique et de

satisfaire aux normes de potabilité concernant les concentrations de THM. Ils mettent en oeuvre des traitements d'oxydation par l'ozone suivi d'une étape de filtration sur charbon actif en grain. L'ozone provoque une augmentation de la biodégradabilité de la matière organique, une partie de celle-ci est ensuite éliminée par filtration biologique. Le chlore est alors utilisé au stade final du traitement. L'utilisation des filières biologiques a permis un progrès dans la qualité de l'eau produite (élimination de certains micro-polluants, amélioration du goût et de l'odeur, réduction de la demande en chlore et des sous produits de désinfection, réduction de la teneur en matière organique biodégradable). En fin de traitement l'eau satisfait généralement aux normes de potabilité. Cependant il est difficile de maintenir la stabilité chimique et biologique de l'eau au cours de sa distribution, et principalement dans les parties terminales des réseaux de distribution, où l'eau séjourne longtemps dans les canalisations. La reviviscence bactérienne, largement favorisée par un excès de matière organique biodégradable, constitue la base d'une chaîne trophique pouvant aboutir au développement d'organismes supérieurs indésirables.

Produire une eau de bonne qualité implique en partie, une réduction de la teneur en matière organique de l'eau et notamment de sa fraction biodégradable. A l'heure actuelle, les problèmes liés à la matière organique biodégradable (MOB) concernent les aspects suivants:

- sa mesure: elle n'est actuellement possible qu'à partir de tests biologiques basés sur deux concepts, le carbone organique assimilable (COA) et le carbone organique dissous biodégradable (CODB). Ces tests reposent sur le suivi de la croissance bactérienne ou de la décroissance de la concentration en carbone organique dissous (COD) dans un échantillon d'eau incubé en présence de souches bactériennes pures ou d'une flore naturelle mixte.
- son contrôle au cours des différentes étapes de potabilisation de l'eau afin d'optimiser les traitements, de tester l'efficacité de nouveaux procédés et d'examiner la qualité des eaux produites.
- son évolution le long des réseaux de distribution et sa relation avec la recroissance bactérienne.

Notre étude a eu pour objectif d'apporter quelques éléments de réponse aux problèmes posés par la matière organique biodégradable de l'eau, tant au niveau de sa mesure, que de son devenir au cours des traitements d'oxydation et dans les réseaux de distribution. Ce travail a donc comporté trois parties:

- \* la première partie (*étude méthodologique*) a porté sur la signification de la mesure de carbone organique dissous biodégradable. Afin de mieux maîtriser la technique utilisant un inoculum fixé, développée dans notre laboratoire, nous avons examiné l'influence des différentes conditions expérimentales susceptibles d'affecter le résultat. En outre, les valeurs de CODB obtenues par cette méthode ont été comparées à celles obtenues par d'autres techniques d'évaluation de la matière organique biodégradable. Par ailleurs, il nous est apparu important d'établir la relation entre les concentrations de CODB et les maxima de croissance de souches bactériennes pures ou d'une flore bactérienne mixte provenant du milieu naturel. Cette approche a permis d'apprécier si une mesure de CODB traduisait fidèlement le potentiel de recroissance bactérienne d'une eau.

- \* La deuxième partie du travail (*étude de laboratoire*) a concerné les effets de l'oxydation par l'ozone (soit seul, soit couplé au peroxyde d'hydrogène ou à un catalyseur) sur l'augmentation de la biodégradabilité de la matière organique. L'idée selon laquelle l'ozone provoque une augmentation de la quantité de matière organique biodégradable n'est pas nouvelle. Cependant peu d'études, à notre connaissance, présentent une approche systématique de la question (effet de la dose d'oxydant et effet du temps de contact sur la quantité de CODB formé et de COD minéralisé).

- \* Finalement, la troisième partie (*étude de terrain*) a porté sur le suivi de l'évolution de la qualité bactériologique de l'eau et de certains paramètres physico-chimiques (température, résiduel de chlore, CODB) le long d'un réseau de distribution. Cette étude a permis de quantifier la recroissance bactérienne et d'élaborer un modèle d'alerte (AL COL) d'apparition des coliformes sur les sites d'un réseau de distribution. Elle a été basée sur le contrôle

hebdomadaire pendant un an, de la qualité de l'eau en sortie d'usine et sur différents sites d'un réseau de distribution de la banlieue parisienne alimenté par l'usine de potabilisation de Méry sur Oise.

Ces différents aspects ont fait l'objet de sept projets d'articles qui vont être successivement présentés .

# **Chapitre I**

## **Mesure de la Matière organique biodégradable des eaux (Etude méthodologique)**



## 1) Les différentes méthodes de mesure de la matière organique biodégradable des eaux.

La teneur en matière organique des eaux naturelles varie en général de 2 à 10 mg/l (mesuré avec un analyseur de carbone organique total), 90% sont sous forme de carbone organique dissous (COD) et le reste sous forme particulaire (Thurman, 1985). A ce jour, personne n'a pu établir une liste exhaustive de toutes les molécules constituant la matière organique. La difficulté de cette approche résulte (Block et Mathieu, 1991):

\* **De la grande complexité de la matrice organique** (mélange de plusieurs centaines de molécules simples et d'hétéropolymères). Elle comprend, entre autres (Thurman, 1985):

- *des substances humiques*: elles sont révélées après extraction sur résine micro-poreuse XAD en milieu acide. Ces matières humiques, représentant environ 50% du COD se divisent en deux fractions, les acides humiques (10% du COD) et les acides fulviques (40% du COD).

- *des acides hydrophiles*: ils représentent la moitié des substances non retenues par la résine XAD. Cette fraction serait essentiellement composée de sucres acides et d'acides organiques simples ou polymérisés.

- *des molécules identifiables par analyses chimiques spécifiques*: elles regroupent l'autre moitié des composés non retenus par la résine XAD. Ce sont des hydrates de carbone, des acides aminés, des acides carboxyliques, des hydrocarbures et d'autres composés organiques à l'état de trace.

\* **De la très faible concentration de ces composés** (nécessité d'étapes de concentration-extraction plus ou moins sélectives).

\* **Des limites de l'analyse physico-chimique** (techniques insuffisamment sensibles, longues à mettre en oeuvre et nécessitant des équipements très sophistiqués).



La matière organique se divise en deux fractions distinctes, l'une biodégradable et l'autre réfractaire à la biodégradation. En l'état actuel de nos connaissances, la mesure de la fraction biodégradable nécessite la mise en oeuvre de tests biologiques dont la séquence a pu être simplifiée comme suit (Mathieu, 1992):

- Pré-traitement du matériel et des échantillons d'eau (préparation de la verrerie, inactivation des bactéries contenues dans l'échantillon...).
- Conditionnement de l'inoculum bactérien (pré culture, stockage...).
- Inoculation et incubation des échantillons.
- Mesure d'un paramètre d'estimation de la biodégradation (production de biomasse, décroissance du carbone organique dissous...).
- Expression des résultats ( $\mu\text{g C}$  équivalent acétate/l, mg C/l...).

Depuis les travaux de Van der Kooij *et al.* (1982), de nombreuses méthodes d'estimation de la MOB dans les eaux, basées sur deux concepts le carbone organique assimilable (COA) et le carbone organique dissous biodégradable (CODB), ont été proposées (Huck, 1990)(tableau 1):

***- Méthodes exprimant la matière organique biodégradable sous forme de COA.***

L'inoculum peut être un mélange de souches bactériennes pures cultivées et pré-conditionnées au laboratoire ( Van der Kooij *et al.*, 1982; Van der Kooij and Hijnen, 1984; Kemmy *et al.*, 1989; Kaplan *et al.*, 1993; Lechevallier *et al.*, 1993) ou constitué de bactéries de l'environnement (Stanfield and Jago, 1987). Le maximum de croissance bactérienne ( $N_{\text{max}}$ ) observé dans l'échantillon après incubation est enregistré (comptage de colonies, mesure de l'ATP...) et converti en COA grâce à des courbes de calibration établies en présence de différentes concentrations d'un composé organique standard (acétate, oxalate...).

***- Méthodes exprimant la matière organique biodégradable sous forme de CODB.***

L'inoculum est constitué de bactéries de l'environnement, en suspension (Servais *et al.*, 1987) ou fixées sur un support (Joret et Levi, 1986; Frias *et al.*, 1992; Mogren *et al.*, 1990). Le CODB est estimé par différence entre le COD initial de l'échantillon et le COD minimum observé au cours de l'incubation.

**Tableau 1:** Méthodes de mesure de la MOB dans les eaux potables

| AUTEUR   | TRAITEMENT de l'EAU | INOCULUM  | INCUBATION                        | Paramètre MESURE | EXPRESSION DES RESULTATS  |
|--|---------------------|---|-----------------------------------|------------------|---|
| Van der Kooij <i>et al.</i> , 1982<br>Van der Kooij and Hijnen, 1984 | Pasteurisation      | Cultures pures <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 + <i>Spirillum</i> NOX (P17+NOX)  | 20 j. à 15°C                      | UFC/ml           | COA calibration dans une gamme étalon d'acétate de sodium (µg C eq. acétate/l)      |
| Kemmy <i>et al.</i> , 1989   | Filtration          | Mélange de 4 espèces : <i>Pseudomonas fl.</i> + <i>Curtobacterium</i> + <i>Corynebacterium</i> + 1 espèce de type corineforme | 6 j. à 20°C                       | UFC/ml           | COA Calibration dans un mélange de composés organiques (µg C/l)                     |
| Stanfield et JAGO, 1987  | Filtration          | Eau de rivière<br>Effluent de filtre à sable  | Jusqu'à l'obtention de N max 20°C | ATP              | COA - facteur de conversion standard (µg C/l)                                       |
| Werner et Hambsch, 1986  | Filtration          | Récupération des bactéries de l'échantillon sur le filtre   | 60 h                              | turbidité        | -Taux de croissance (µ)<br>-Taux de rendement (log Y/Y <sub>0</sub> )               |
| Reasonner et Rice, 1989  | Filtration          | <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>   | 5 j. à 20°C                       | UFC/ml           | Log N <sub>5</sub> /N <sub>0</sub>  |
| SERVAIS <i>et al.</i> , 1987   | Filtration          | Eau de rivière  | 28 j. à 20°C                      | COD              | COD <sub>B</sub> =COD <sub>i</sub> - COD <sub>f</sub><br>(mgC/l)                    |
| JORET et LEVI, 1986  | Sans                | Sable biologiquement actif (filtre à sable sans pré chloration)   | 5 j. à 20°C                       | COD              | COD <sub>B</sub> =COD <sub>i</sub> -COD <sub>R</sub><br>(mgC/l)                     |
| FRIAS <i>et al.</i> , 1992   | Filtration          | Colonne contenant un support colonisé par un biofilm  | quelques heures                   | COD              | COD <sub>B</sub> = COD <sub>entrée</sub> - COD <sub>sortie colonne</sub><br>(mgC/l) |

## **2) Méthode de mesure du CODB utilisant un inoculum bactérien fixé sur du sable.**

Ce test biologique d'évaluation de la MOB, mis au point au laboratoire de microbiologie d'Anjou Recherche, a d'abord été développé afin d'évaluer l'efficacité des différentes étapes de traitement de potabilisation vis-à-vis de l'élimination de la matière organique biodégradable (Joret et Lévi, 1986).

Après description de cette méthode mettant en oeuvre des bactéries fixées sur du sable, nous avons souhaité donner quelques informations sur la validité de cette technique, notamment en ce qui concerne l'évolution des valeurs de CODB en fonction de la dilution d'échantillons d'eau de rivière et du point de vue de la répétabilité de la méthode.

### ***2.1) Description du test biologique.***

Un échantillon d'eau de 300 ml est incubé en présence de 100 grammes de sable colonisé par une biomasse vivante (en provenance d'un filtre à sable d'une station de potabilisation ne comportant pas de pré-traitement au moyen d'un oxydant à effet rémanent). L'incubation est effectuée dans des erlenmeyers à l'intérieur d'une enceinte thermostatée à 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) (Figure 1). Chaque dispositif est aéré avec de l'air préalablement débarrassé de carbone organique par barbotage dans de l'eau distillée. Le carbone organique dissous (COD) est mesuré au début de l'essai (CODi: COD initial au début de l'essai) puis tous les jours au cours de l'incubation, au moyen d'un analyseur de carbone organique (Figure 2). L'expérience est arrêtée lorsque la valeur de COD mesurée a atteint un minimum pendant trois jours consécutifs. Cette valeur minimale, correspondant au carbone organique dissous réfractaire (CODR), est généralement atteinte après une semaine d'incubation (Joret et Lévi, 1986). La quantité de carbone organique dissous biodégradable (CODB) est obtenue par différence entre le CODi et le CODR.

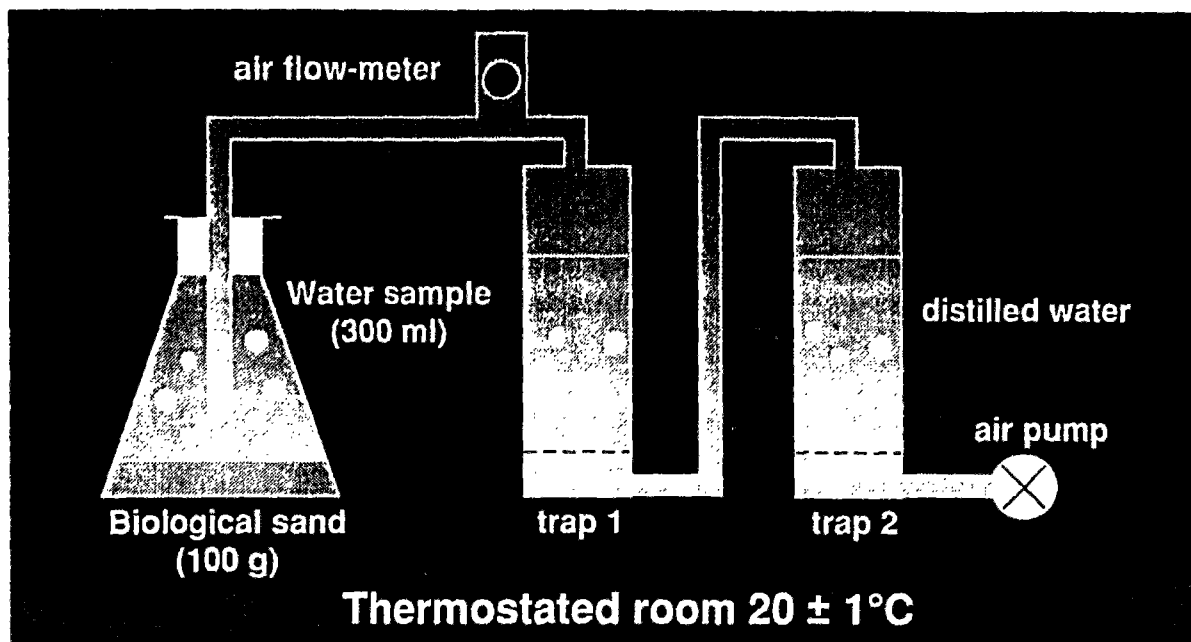


Figure 1: Détermination du CODB en présence d'un inoculum bactérien fixé sur du sable.

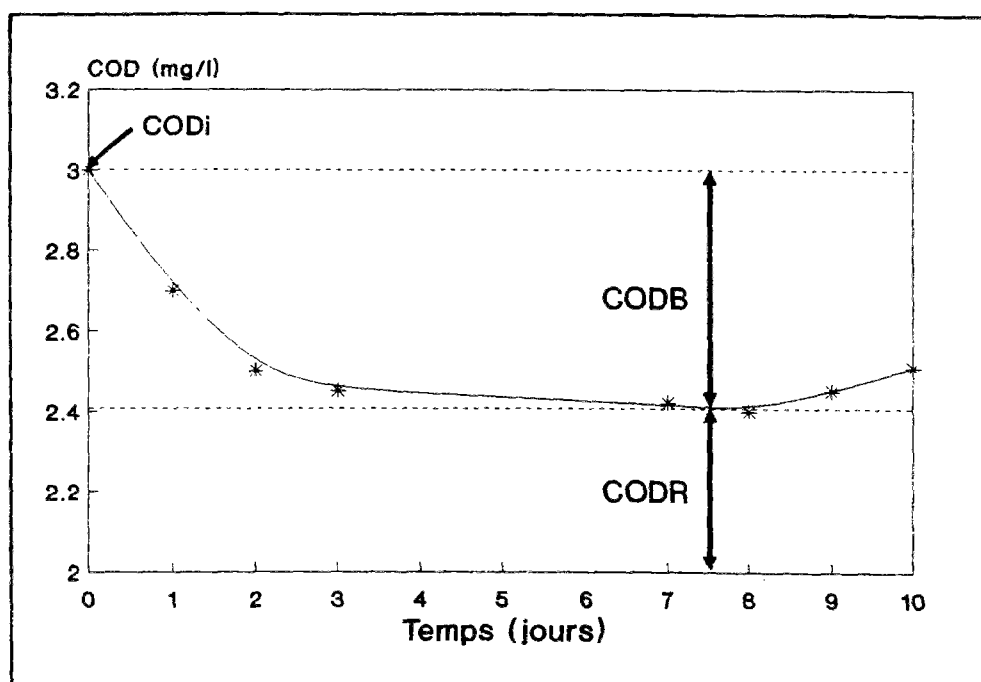
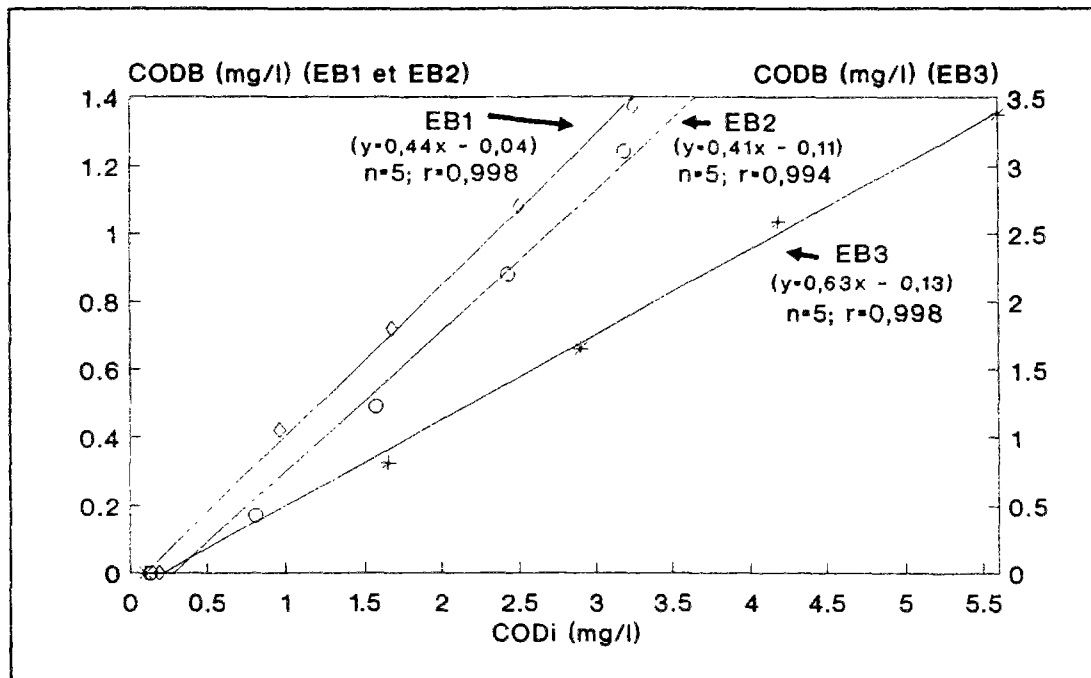


Figure 2: Evolution du COD dans un échantillon d'eau de rivière.

## 2.2) Relation entre les valeurs de COD et de CODB dans des échantillons d'eau de rivière dilués.

Les teneurs en CODi et CODB ont été mesurées pour 3 échantillons d'eau de surface purs (EB1: CODi=3,24 mg/l; EB2: CODi=3,18 mg/l; EB3: CODi=5,60 mg/l) ou dilués (au 1/4, 1/2 et 3/4)

dans de l'eau ultra pure (Millipore, système milli Q). La figure 3 représente la relation entre les concentrations de CODi et de CODB mesurées dans les 3 échantillons d'eau de rivière dilués. Elle indique une bonne corrélation entre ces deux paramètres en fonction du facteur de dilution ( $r_{EB1}=0,998$ ;  $r_{EB2}=0,994$ ;  $r_{EB3}=0,998$ ).



**Figure 3:** Relation entre les valeurs de CODi et de CODB dans 3 échantillons d'eau de rivière (EB1, EB2 et EB3) purs et dilués dans de l'eau ultrapure.

Ces résultats ont confirmé ceux observés par Joret et *al.* (1989a), pour lesquels le coefficient de corrélation entre les valeurs de CODi et de CODB était de 0,999 dans le cas d'une série de 6 dilutions d'une eau usée (variation du CODi de 3,2 mg/l à 64 mg/l).

### 2.3) Répétabilité de la méthode.

La répétabilité de la technique a été étudiée sur 2 types d'eau: un échantillon d'eau de rivière (essai réalisé en 4 exemplaires) et une eau ozonée (essai réalisé en 3 exemplaires) (Tableau 2).

|                | CODi              |          |            | CODB              |          |            |
|----------------|-------------------|----------|------------|-------------------|----------|------------|
|                | moyenne<br>(mg/l) | $\sigma$ | C V<br>(%) | moyenne<br>(mg/l) | $\sigma$ | C V<br>(%) |
| Eau de rivière | 3,12              | 0,05     | 1,67       | 1,50              | 0,15     | 10,03      |
| Eau ozonée     | 1,53              | 0,02     | 1,14       | 0,81              | 0,03     | 3,85       |

**Tableau 2:** Moyenne, écart type ( $\sigma$ ) et coefficient de variation (C V) pour les valeurs de CODi et de CODB enregistrées dans une eau de rivière (n=4) et une eau ozonée (n=3).

Les coefficients de variation sur les valeurs de CODi ont été faibles: de l'ordre de 1-2%. En ce qui concerne les valeurs de CODB, les coefficients de variation enregistrés pour l'eau de rivière et pour l'eau ozonée ont été respectivement de 10% et de 4%. Ces résultats sont satisfaisants pour un test biologique.

Des résultats identiques ont été reportés lors de l'étude de la répétabilité des mesures de CODi et de CODB (essai en 10 réplicats) pour une eau distribuée (CODi=1,17 mg/l; CODB=0,63 mg/l) et une eau de rivière (CODi=2,84 mg/l; CODB=1,15 mg/l) (Joret et *al.*, 1988). Pour ces 2 types d'eau, les coefficients de variation des résultats de CODB ont été respectivement de 2,5% et de 5%. Mathieu (1992) a trouvé des coefficients de variation un peu plus fort, de 11-13%, 12-13% et 14-15%, respectivement dans le cas d'une eau de rivière (CODB=1 mg/l), d'une eau ozonée (CODB=0,79 mg/l) et d'une eau distribuée (CODB=0,69 mg/l).

### 3) Situation du problème et objectifs de l'étude.

La multiplicité des méthodes existantes d'évaluation de la MOB a soulevé diverses questions concernant le type d'inoculum utilisé (souches pures ou flore naturelle mixte), le choix du paramètre du suivi de la biomasse bactérienne (comptage sur gélose, ATP,...), la sensibilité des

différentes techniques utilisées, notamment pour des eaux potables, et la correspondance entre les valeurs données par différentes techniques.

Face à cette problématique, nous avons orienté plus particulièrement notre travail vers la signification de la mesure de CODB déterminée par la technique mettant en oeuvre un inoculum de bactéries fixées (Joret et Levi, 1986), et la comparaison des valeurs données par cette méthode à celles obtenues par d'autres techniques utilisant des inocula en suspension de populations bactériennes naturelles (Servais *et al.*, 1987) ou de souches pures de bactéries (Van der Kooij *et al.*, 1982; Kaplan *et al.*, 1993).

Pour la technique mettant en oeuvre des bactéries fixées, utilisée dans notre laboratoire, nous avons étudié l'effet des différentes conditions expérimentales susceptibles d'affecter le résultat: la taille de l'inoculum bactérien, la pratique de l'aération au cours de l'incubation des échantillons et la durée de l'incubation. L'effet de ces différents paramètres a aussi été mesuré en ce qui concerne la technique mettant en oeuvre un inoculum de bactéries en suspension (Servais *et al.*, 1987). Les résultats obtenus par chacune des deux méthodes ont ensuite été comparés pour différents types d'eau.

Finalement nous avons cherché à savoir si la mesure du CODB (déterminée en présence de bactéries fixées sur du sable) traduisait fidèlement le potentiel de recroissance bactérienne de l'eau. Ce travail a porté sur la mise en évidence d'une relation existant entre les concentrations de CODB et les maxima de croissance de souches pures (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX) ainsi que d'une flore bactérienne naturelle mixte. Nous avons aussi établi une correspondance entre les valeurs de CODB et de COA.

Ces différents aspects méthodologiques ont été développés dans les deux projets d'articles qui suivent: "*Comparison of two techniques for measuring biodegradable dissolved organic carbon in water*" et "*La mesure du CODB: un index du potentiel de reviviscence bactérienne des eaux*".

## Références bibliographiques

Block J.C. et Mathieu L., 1991. Mesure de la matière organique biodégradable des eaux potables. *Analisis*, **19**: 54-57.

Frias J., Ribas F. and Lucena F., 1992. A method for the measurement of biodegradable organic carbon in waters. *Wat. Res.*, **26**: 255-258.

Huck P.M., 1990. Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth in drinking water. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **82** :78-86.

Joret J.C. et Levi Y., 1986. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, **39** : 3-9.

Joret J.C., Levi Y., Dupin T. and Gibert M., 1988. Rapid method for estimating bioeliminable organic carbon in water. *AWWA, Annual conf.*, Orlando, FL.

Joret J.C., Levi Y. and Gibert M., 1989a. The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC): a tool in water treatment. *Wat. Supply*, **7** : 41-45.

Kaplan L.A., Bott T.L. and Reasonner D.J., 1993. Evaluation and simplification of the assimilable organic carbon nutrient bioassay for bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1532-1539.

Kemmy F.A., Fry J.C. and Breach R.A., 1989. Development and operational implementation of a modified and simplified method for determination of assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. *Water Sci. Technol.*, **21** : 155-159.

LeChevallier M.W., Shaw N.E., Kaplan L.A. and Bott T.M. 1993. Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1526-1531.

Mathieu L., 1992. Matière organique biodégradable et stabilité biologique des eaux au cours de leur distribution. *Thèse de doctorat de l'université de Nancy, mention de Chimie et Microbiologie de l'eau.*



Mogren E.M., Scarpino P. and Summers R.S., 1990. Measurement of biodegradable dissolved organic carbon in drinking water. *Proc. Annual AWWA Conf.*. Cincinnati, OH.

Reasonner D.J. and Rice E.W., 1989. US EPA experiences with AOC and coliform growth response assays. *Workshop on measurement of AOC in the field of drinking water treatment*. Karlsruhe; RFA. 29 Nov.

Servais P., Billen G. and Hascoet M.C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Wat. Res.*, **21** : 445-450.

Stanfield G. and Jago P. H., 1987. The development and use of a method for measuring the concentration of assimilable organic carbon in water. *WRC environment report PRU 1628-M*. UK.

Thurman E.M., 1985. Developments in biochemistry: organic geochemistry of natural waters. M. Nijhoff, Dr W. Junk Publishers, DORDRECHT.

Van der Kooij D. and Hijnen W.A.M., 1984. Substrate utilization by an oxalate consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47** : 551-559.

Van der Kooij. D., Wisser A. and Hijnen W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **74** : 540-545.

Werner P. and Hambsch B., 1986. Investigations on the growth of bacteria in drinking water. *Wat. Supply*. **4**: 227-232.

**COMPARISON OF TWO TECHNIQUES FOR MEASURING  
BIODEGRADABLE DISSOLVED ORGANIC CARBON IN WATER.**

**Christian VOLK \*, Christophe RENNER, Coralie ROBERT and Jean Claude JORET \*.**

**ANJOU RECHERCHE, Centre de Recherche de la Compagnie Générale  
des Eaux. Chemin de la digue, BP 76. 78600 Maisons - Laffitte. France.**

**Tel: 39 62 34 56  
Fax: 39 62 70 75**

**Soumis à *Environmental Technology* (Septembre 1993)**

## Abstract.

This article compared two methods for measuring biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) concentrations in water. These techniques consist of following the reduction of dissolved organic carbon (DOC) in water samples incubated either for 30 days with suspended bacteria or for 5 - 7 days with bacteria attached to sand particles. BDOC concentration is the difference between initial and minimum DOC values.

The aim of this work was to assess the effect of operational conditions on the final BDOC result. The role of inoculum size, incubation period and aeration were tested. Finally, BDOC results obtained from these two methods were compared.

For BDOC determination using attached bacteria, the results showed that a sand:water ratio of 100 g:300 ml allowed a rapid decrease in DOC concentration and an optimal biodegradation of the organic matter. Results of BDOC measurements increased with sand:water ratio, showing biosorption of a low fraction of DOC (0.10 - 0.20 mg DOC per 100 g of sand). Moreover, aeration accelerated the biodegradation process and increased the BDOC results (linear relationship:  $\text{BDOC}_{\text{non aerated}} = 0.72 \text{ BDOC}_{\text{aerated}} + 0.10$ ;  $r = 0.90$ ;  $n = 47$ ).

For the BDOC determination using suspended bacteria, aeration had no effect on BDOC values. However, for most of water samples, biodegradation was uncomplete after a 28 day incubation period (depending on the water type). BDOC concentrations determined after 28 days increased by 0 - 125 % when incubation was extended to 85 - 120 days.

The estimation of BDOC concentration depended on the applied method. BDOC values were higher when using attached bacteria ( $4 \text{ l h}^{-1}$  aeration) (linear relationship:  $\text{BDOC}_{\text{susp.}} = 0.61 \text{ BDOC}_{\text{fix.}} - 0.05$ ;  $r = 0.93$ ;  $n=30$ ), probably resulting from a greater bacterial diversity in biological sand than in river water inoculum, a higher biodegradation ability for fixed bacteria than for suspended bacteria and a low DOC adsorption on sand biofilms.

## Key words

Dissolved organic carbon (DOC) - Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) - Bacteria attached to sand - Suspended bacteria.

## Introduction.

The growth of bacteria in distribution systems in the form of a biofilm on pipe surfaces can lead to the deterioration of water quality, including high bacterial concentrations, bad tastes, odor or color, pipe corrosion and constitutes a food source for macroinvertebrates (1, 2, 3, 4, 5). The concentration of biodegradable organic matter is important for bacterial regrowth (6, 7) because organic carbon is utilized by the heterotrophic flora for production of new cellular material and as a source of energy.

Several biological assays for the evaluation of the biodegradable organic matter content and the regrowth potential of a water sample have been described (8). These biological tests are based on 2 concepts: Assimilable Organic Carbon (AOC) and Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC). The first to be developed (AOC) consists in following bacterial growth (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* NOX...) in a water sample. The maximum growth, reached after a few day incubation period, is converted into units of Carbon ( $\mu\text{g C eq. acetate l}^{-1}$ ) by using growth yields of bacteria in known solutions of organic molecules (9, 10). This concept of AOC had generated different methods previously reviewed (8).

In the second approach, BDOC content represents the fraction of dissolved organic carbon (DOC) which is assimilated and mineralized by the heterotrophic flora. The water sample is incubated either up to 28 days with suspended indigenous bacteria or 5 - 7 days with bacteria attached to sand particles (11, 12, 13, 14). BDOC corresponds to the decrease in DOC content (measured with a total organic carbon analyzer) observed during the incubation period.

### **BDOC determination using suspended bacteria .**

The filtered water sample (on  $0.2 \mu\text{m}$  pore size filter) is seeded with mixed autochthonous bacteria from surface water and incubated in the dark for 28 days at  $20^{\circ}\text{C}$ . BDOC can be determined by two procedures (14). In the first one, bacterial biomass and mortality rate are followed, then the integrated flux of mortality (F) during the incubation period is

calculated and divided by the growth yield (Y) to give an estimate of BDOC ( $BDOC = F/Y$ ). This approach, very sensitive but also long, is used when BDOC levels are very low. The second procedure is more simple. The decrease in DOC concentration is followed until a plateau is reached and BDOC is the difference between initial and final DOC values.

#### **BDOC determination using bacteria fixed on sand .**

This method is also based on the decrease in DOC concentration, but the water sample is incubated at 20°C in aerated conditions in the presence of fixed natural bacteria. The inoculum consists of a sand colonized with bacteria. Using such an abundant fixed flora allows a rapid response (minimum DOC is reached after a few days incubation period) (11, 12, 13).

In experiments performed with colonized sands from different origins, it was shown that DOC reduction kinetics varied, depending on the origin of the inoculum. However, for a given water sample, the minimum DOC values were similar (i. e. independent of the origin of the sand) (13). Block *et al.* (15) reported that indigenous mixed bacterial populations can be used reliably as standard inocula for BDOC determination without introducing excessive variability.

The experiments presented below were intended to assess the effect of parameters which were likely to influence BDOC results. The effect of the inoculum size, the incubation period and the aeration on the BDOC determination using either sand fixed or suspended bacteria were tested. Finally, BDOC values obtained with sand fixed bacteria and suspended bacteria were compared .

### **Material and methods.**

The glassware was muffled for 4 hours at 550°C. The experiments were carried out on river waters (River Seine, River Oise and River Marne, France), partially treated waters and distributed waters (Mery-sur-Oise, Choisy-le-Roi and Neuilly-sur-Marne treatment plants, France). River and settled water samples were filtered (glass fiber prefilter, Durieux, No. 28) to remove suspended particles. Sodium thiosulfate (0.1 ml of a 100 g l<sup>-1</sup> sodium thiosulfate solution per 500 ml of water sample) was added to neutralize chlorine residuals in distributed water samples.

### 1) BDOC determination using bacteria fixed on sand.

BDOC determinations were performed using the method described by Joret *et al.* (11, 12, 13).

**Preparation of the biological sand:** the sand colonized with bacteria (biological sand) was freshly sampled from the sand filters of a water treatment plant without a prechlorination stage. It was prewashed 10 times with about 3 l of dechlorinated tap water then 3 times with 1 l of distilled water. The DOC content of the last washing water was measured and compared with the DOC content of distilled water. The biological sand was considered ready for use as inoculum when no detectable DOC was released by the sand. If released DOC was detected, additional washings were performed.

**Storage of the sand:** a fraction of washed biological sand was stored in dechlorinated tap water at room temperature. Before use, the colonized sand was rinsed 3 times with fresh dechlorinated tap water (V:w ratio of approximately 3:1).

**Methodology of the bioassay:** the initial DOC ( $\text{DOC}_0$ ) of the water sample to be analyzed was checked. 100 g of biological sand were weighed in a 500 ml-flask. The sand was rinsed with 100 ml of water sample. Then 300 ml of water sample were poured gently into the flask containing sand. The DOC of the water sample (in the presence of sand) was checked again ( $\text{DOC}_1$ ). If difference between  $\text{DOC}_1$  and  $\text{DOC}_0$  was less than  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ , the test was begun by aerating the water sample (flow rate:  $4 \text{ l h}^{-1}$ ) (Figure 1). If this difference was higher than  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ , the biological sand was rinsed again with 100 ml of the water sample. The initial DOC value ( $\text{DOC}_i$ ) was defined as the mean of  $\text{DOC}_0$  and  $\text{DOC}_1$  values.

**DOC measurements and BDOC calculation:** the DOC content of the water sample incubated with biological sand was measured daily until a plateau was reached. 20 ml of water sample were filtered (Millipore, Durapore, polyvinylidene fluoride filter units, diameter = 25 mm, pore size =  $0.45 \mu\text{m}$ ; prewashed three times with 20 ml of distilled water). The DOC concentrations were measured in duplicate by persulfate oxidation and

IR detection (Dorhman DC 80; OI 700, TOC analyzer). BDOC values were calculated from the difference between initial and minimum DOC.

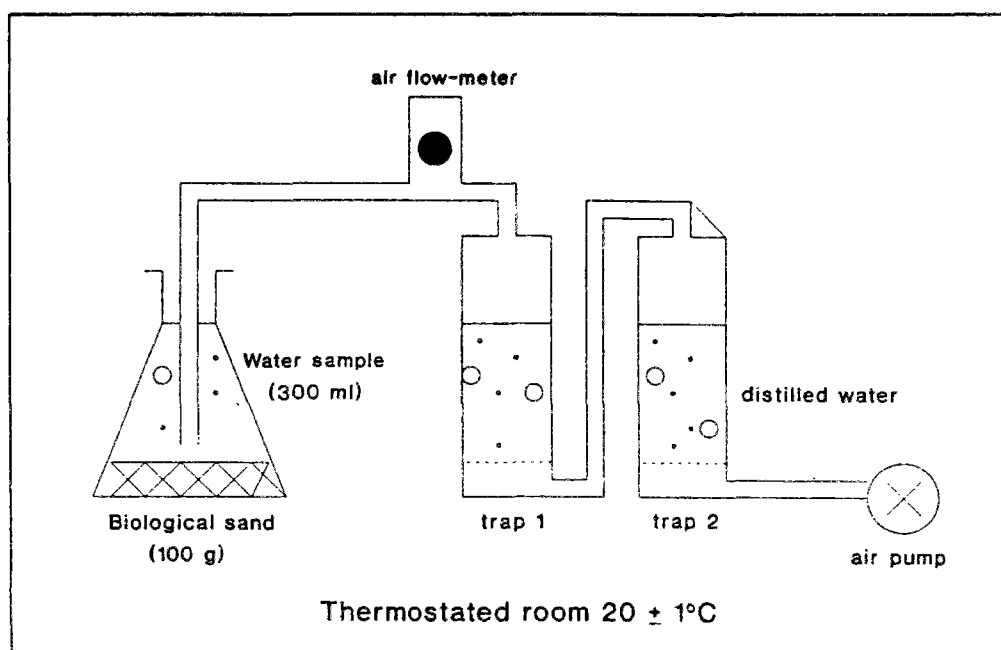


Figure 1: Schematic diagram of the apparatus used to measure BDOC concentrations with bacteria attached to sand.

## 2) BDOC determination using suspended bacteria.

The water sample (500 ml) was sterilized by filtration through 0.2  $\mu\text{m}$  pore size membrane (polycarbonate membrane, Nuclepore, diameter=47 mm, rinsed with 500 ml of distilled water then with 50-100 ml of water sample). Five ml of pre-filtered River Seine water (polycarbonate membrane, Nuclepore, diameter=47 mm; pore size = 2 $\mu\text{m}$ ) was added as inoculum. Incubation of inoculated samples was performed at 20°C  $\pm$  1°C in the dark for 4 weeks (14). DOC measurements (performed after 3, 5, 10, 15, 23 and 28 days of incubation) and BDOC calculation were done as previously. For some assays, the incubation period was extended up to 85-120 days.

## 3) Epifluorescent counts.

Enumeration of bacteria was carried out by epifluorescence microscopy after acridine orange staining. One ml of pure or diluted water sample was filtered (black polycarbonate

membrane, Millipore, diameter=47 mm; pore size = 0.2  $\mu\text{m}$ ). Bacteria held back on the membrane were coloured for 10 min. with a 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  acridine orange solution (Merck ref. 1333). 20 microscopic fields (Leitz microscope, Dialux 20) were examined under UV excitation (Orsam HBO 50 W). Results were expressed as bacteria  $\text{ml}^{-1}$  (Bact.  $\text{ml}^{-1}$ ).

## Results and discussion

The technique for measuring BDOC concentrations using sand fixed bacteria was originally described with a sand:water ratio of 100g : 300 ml and under a 4  $\text{l h}^{-1}$  aeration regime (11). In the method using suspended bacteria, water samples were inoculated with 1% (v/v) of river water inoculum and incubated up to 28 days without any aeration (14). In order to assess the effect of parameters likely to affect the result of BDOC measurement, BDOC determinations were performed with either fixed or suspended bacteria under different experimental conditions. These included increasing inoculum size, increasing incubation time and changing aeration conditions.

### 1) BDOC determination using bacteria fixed on sand.

#### *Effect of the inoculum size.*

The decrease in DOC during the incubation period was followed for a river water sample (River Oise:  $\text{DOC}_i = 3.25 \text{ mg l}^{-1}$ ) inoculated with different sand:water ratios (Figure 2). The inoculum size affected the kinetics of DOC removal. For the lower sand:water ratios (5 g:300 ml to 50 g:300 ml), a rapid reduction in DOC concentrations was followed by a stagnation of DOC values and then a second DOC decrease was observed. The stagnation stage disappeared completely with a ratio of 100 g:300 ml and DOC decreased sharply to a minimal value within 3 days.

When the sand:water ratio increased, the minimal DOC value (corresponding to the refractory dissolved organic carbon, RDOC) decreased, resulting in increasing estimations of the BDOC concentration (Figure 2). The effect of the sand:water ratio on the measured BDOC concentration was studied for different water samples (River Seine water:



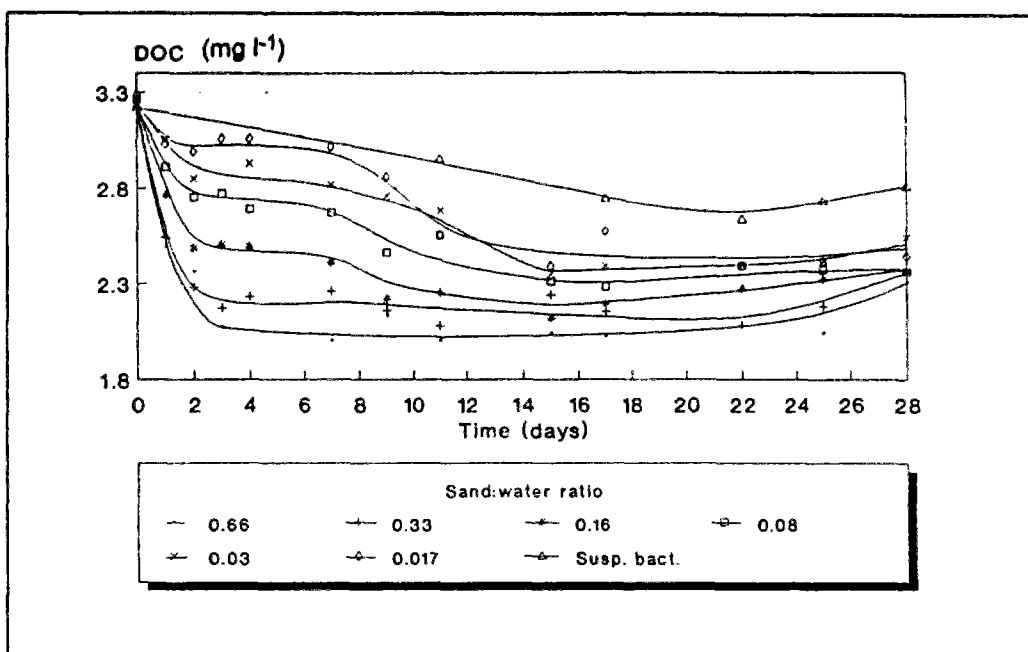


Figure 2: Kinetics of DOC reduction when river water (Oise) was incubated with either a bacterial suspension or increasing quantities of sand colonized by bacteria. ( $4\text{ l h}^{-1}$  aeration)

$\text{DOC}_i = 3.80 \text{ mg l}^{-1}$ ; sand filter effluent:  $\text{DOC}_i = 2.87 \text{ mg l}^{-1}$ ; ozonated water:  $\text{DOC}_i = 3.14 \text{ mg l}^{-1}$ ; River Oise water:  $\text{DOC}_i = 3.25 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Figure 3). As previously observed, measured BDOC concentrations increased with the sand:water ratio. The BDOC versus sand:water ratio curves showed two distinct stages:

- when the sand:water ratio was low (lower than  $10 \text{ g:300 ml}$ ), BDOC measurements increased strongly with the inoculum size. It corresponded to a BDOC increase of 0.6, 0.3, 0.2 and  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  for the River Seine, River Oise, ozonated water and filtered water sample, respectively. A low ratio of  $10 \text{ g:300 ml}$  did not seem to be optimal for biodegradation.
- when the sand:water ratio was higher than  $10 \text{ g:300 ml}$ , estimated BDOC concentration increased slowly and constantly with increasing ratios ( $0.10 - 0.20 \text{ mg per } 100 \text{ g of sand}$ ). This could be mainly the result of an adsorption phenomenon of organic molecules on the sand biofilm.

However, these experiments did not allow an assessment of DOC adsorption that could occur in the first stage of the curves.

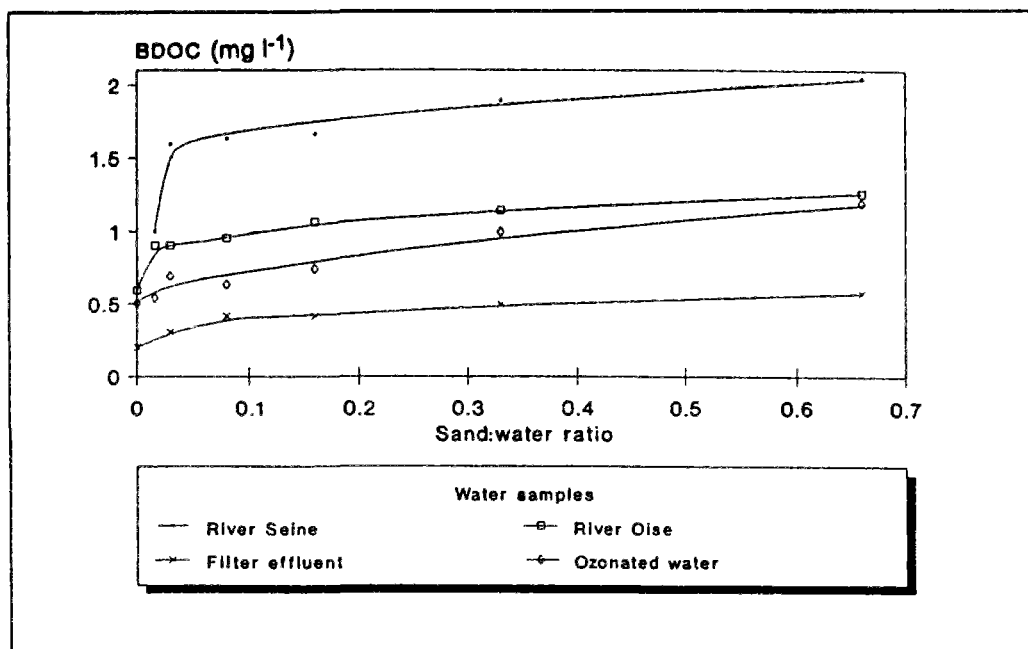


Figure 3: Effect of the sand:water ratio on the apparent BDOC concentrations for different water types. (4 l h<sup>-1</sup> aeration)

Sand:water ratio=0 : water samples incubated with suspended inoculum (river Seine, 1%).

Finally, a sand:water ratio of 100 g:300 ml which is commonly used, seems to be the most appropriate to obtain a rapid response for BDOC determination while minimizing the biosorption effect.

### ***Effect of the incubation period.***

After reaching minimum DOC concentration, considered as RDOC for BDOC calculation, DOC values showed again an increase (Figure 2). This phenomenon was observed with all studied water types and represented a DOC increase of 0.04-0.42 mg l<sup>-1</sup> (2-38%) over the minimum DOC (average = 0.25 ± 0.11 mg l<sup>-1</sup>; n=40) (data not shown). Bacterial lysis or DOC desorption (16) could explain the DOC increase occurring when incubation of the water samples was extended.

### ***Effect of aeration conditions.***

The effect of the aeration flow rate on measured BDOC concentrations was studied for different water samples (River Seine water: DOC<sub>i</sub>=3.35 mg l<sup>-1</sup>; ozonated water from Mery-sur-Oise treatment plant: DOC<sub>i</sub>=3.14 mg l<sup>-1</sup>; ozonated water from Neuilly-sur-Marne treatment plant: DOC<sub>i</sub>=1.73 mg l<sup>-1</sup>; sand filter effluent from Neuilly-sur-Marne

treatment plant:  $\text{DOC}_i = 1.53 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Figure 4). Measured BDOC concentrations were raised when the aeration flow rate was increased up to  $2 \text{ l h}^{-1}$ . The difference between BDOC concentrations measured without aeration and those measured with an air flow of  $2 \text{ l h}^{-1}$  ranged from  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  (23 %) for the filter effluent, up to  $0.55 \text{ mg l}^{-1}$  (92 %) for the ozonated water sample from Mery-sur-Oise. With aeration flow rates higher than  $2 \text{ l h}^{-1}$ , no effect of the air flow on measured BDOC concentrations was observed.

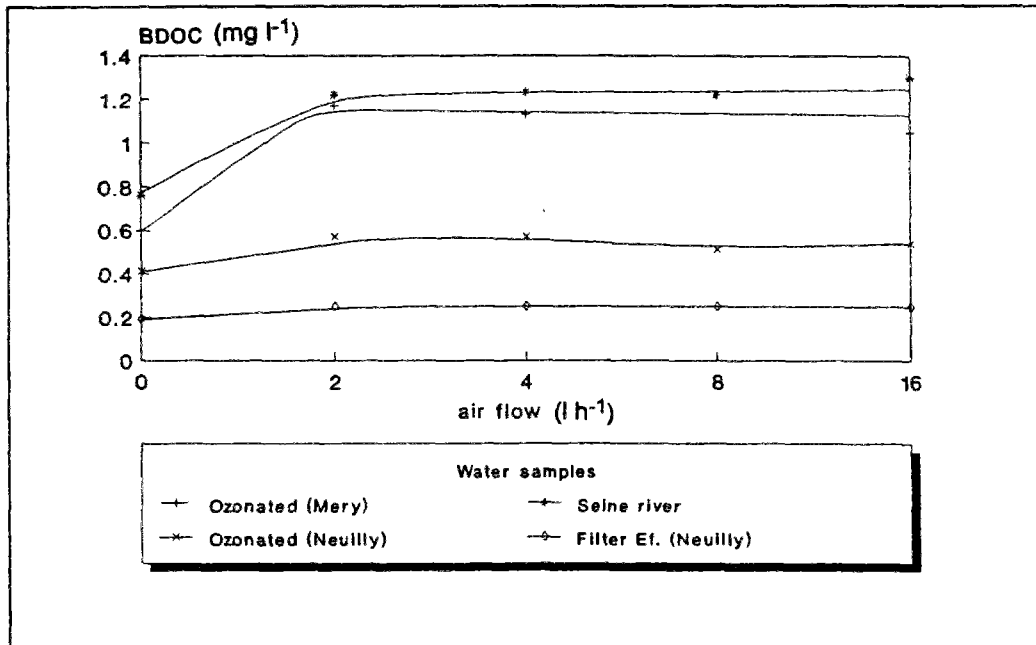


Figure 4: Effect of the air flow on the apparent BDOC concentrations of a river water, a filter effluent and ozonated waters (from Mery and Neuilly treatment plants) (fixed inoculum)

Moreover, BDOC measurements performed without or with a  $4 \text{ l h}^{-1}$  aeration in different water samples (47 studied water samples) showed further evidence that aeration facilitates the DOC removal (Figure 5). Only 5 samples had a BDOC content determined in aerated conditions lower than the one obtained without aeration and, for all of them, the difference observed between the 2 BDOC values was always lower than  $0.10 \text{ mg l}^{-1}$ . Among the 42 water samples with a BDOC value measured in aerated conditions higher than the one determined in non aerated conditions, 23 showed a difference between the two BDOC values higher than  $0.10 \text{ mg l}^{-1}$ , with a maximum of  $0.55 \text{ mg l}^{-1}$ .

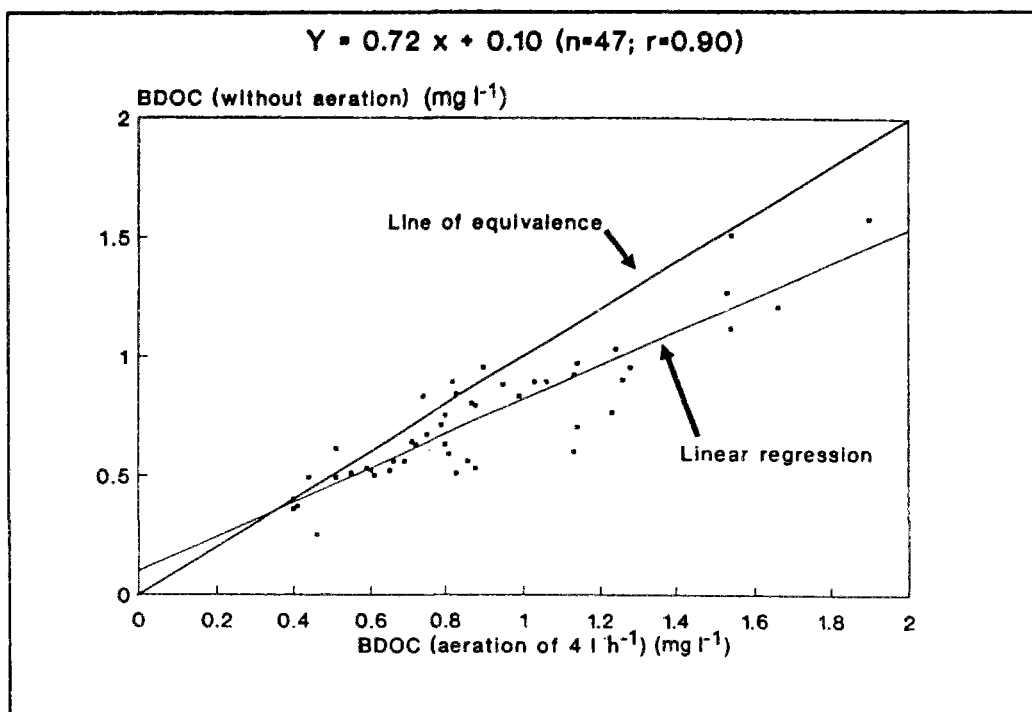


Figure 5: BDOC concentrations for different water samples incubated in aerated ( $4\text{ l h}^{-1}$ ) or non aerated conditions (fixed inoculum).

The effect of aeration seemed to be stronger when BDOC concentrations were high. Among the 47 studied water samples, 27 had a BDOC concentration (aerated conditions) higher than  $0.80\text{ mg l}^{-1}$ . For 66% of them, the difference between the BDOC values measured in aerated conditions and the one determined without aeration was higher than  $0.10\text{ mg l}^{-1}$ . Among the 20 water samples with a BDOC concentration (aerated conditions) lower than  $0.80\text{ mg l}^{-1}$ , only 20% had a difference ( $\text{BDOC}_{\text{aerated}} - \text{BDOC}_{\text{non aerated}}$ ) higher than  $0.10\text{ mg l}^{-1}$ .

Finally, a significant correlation between BDOC results determined in aerated or non aerated conditions was found ( $p=0.01$ ) (Figure 5). The relationship was:

$$(I) \quad \text{BDOC}_{\text{non aerated}} = 0.72 \text{ BDOC}_{\text{aerated}} + 0.10 \quad (r = 0.90; n = 47)$$

Aeration also had a positive influence on the kinetics of DOC degradation as shown by the study of the incubation time required to reach the minimum DOC in aerated and non aerated samples (Figure 6). Most of the aerated water samples reached their minimal DOC value within 3 - 5 days (34 %) or 6 - 8 days (51 %). Non aerated samples needed a longer

incubation period to reach their minimal DOC value (40 % within 6 - 8 days and 55 % within 9 days and more). Mathieu (16) obtained similar results. This author reported that for 400 BDOC measurements performed using bacteria attached to sand and in non aerated conditions, 48 % of water samples reached a minimum DOC value within 8 days and 51 % within 10 days or more.

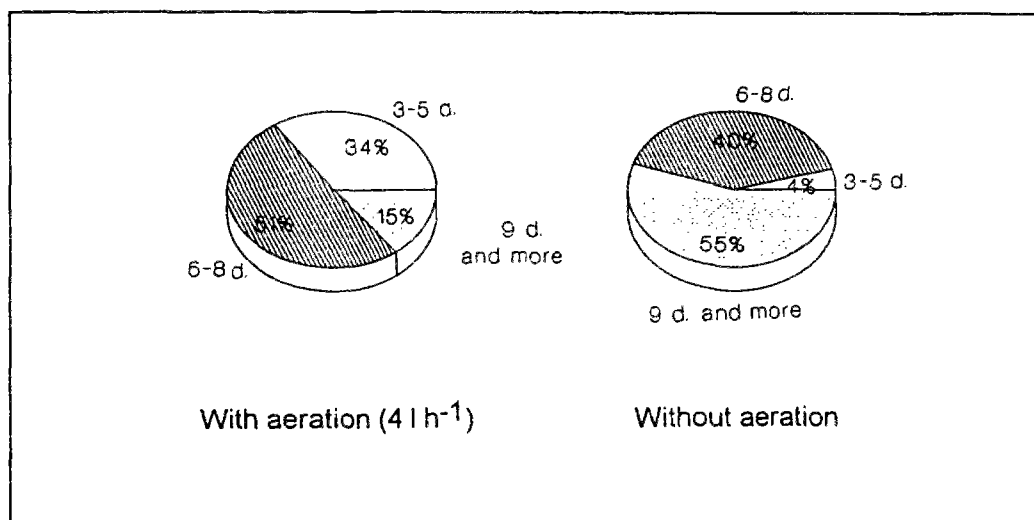


Figure 6: Incubation period to reach minimal DOC value for different water samples (n=47) incubated in aerated (4 l h<sup>-1</sup>) or non aerated conditions (fixed inoculum).

Two hypotheses could explain the effect of aeration on the BDOC determination using sand fixed bacteria:

- aeration may lead to a better homogenization of the water sample. The mixing of water samples on sand allowed faster kinetics of DOC degradation. A method has been developed including the circulation of the water sample on the sand inoculum (17). With this technique, minimum DOC values were obtained within 1 to 5 days.
- aeration results in a higher oxygenation of the microbial flora which could enhance bacterial activity. Without any aeration, the oxygen concentration could become a limiting factor for the biodegradation of some organic substrates.

A stripping of volatile molecules present in the water sample or resulting from bacterial activity was unlikely, aeration showed no effect on BDOC values when water samples were incubated with suspended bacteria under a  $4 \text{ l h}^{-1}$  aeration (Table 1).

## 2) BDOC determination using suspended bacteria.

### *Effect of the inoculum size.*

A sand filter effluent was seeded with increasing amounts of river inoculum (Figure 7). Great differences in the inoculum size (0.04 to 5 %) only had a minor influence on maximum growth and measured BDOC value.

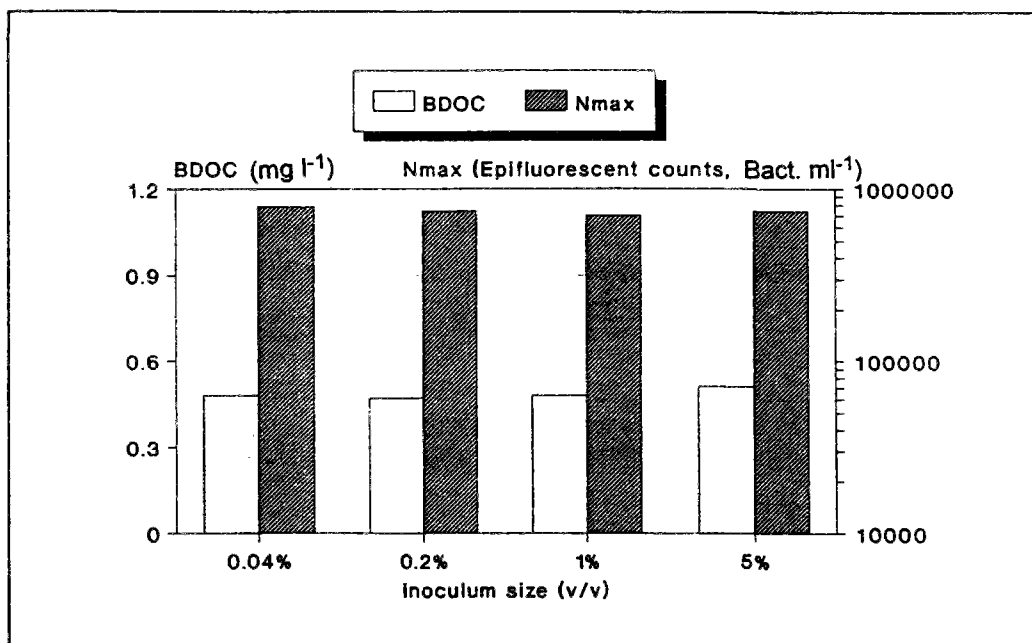


Figure 7: BDOC concentrations and maximum growth (Nmax) for a filter effluent seeded with increasing quantities of river water inoculum.

### *Effect of the incubation period.*

The effect of the incubation period was studied on several water samples: sand filter effluents (from a pilot plant:  $\text{DOC}_i = 2.72 \text{ mg l}^{-1}$ ; from Mery-sur-Oise treatment plant:  $\text{DOC}_i = 3.20 \text{ mg l}^{-1}$ ), river water (River Seine water:  $\text{DOC}_i = 3.83 \text{ mg l}^{-1}$ ; River Oise water:  $\text{DOC}_i = 3.22 \text{ mg l}^{-1}$ ) and an ozonated water ( $\text{DOC}_i = 3.34 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Figure 8). The

influence of incubation time, when using suspended bacteria, was dependent upon the water type or treatment. Biodegradation was mainly incomplete after a 28 day incubation period for the 2 sand filter effluents (these water samples were already submitted to a biological treatment, the remaining biodegradable organic matter could be slowly biodegradable).

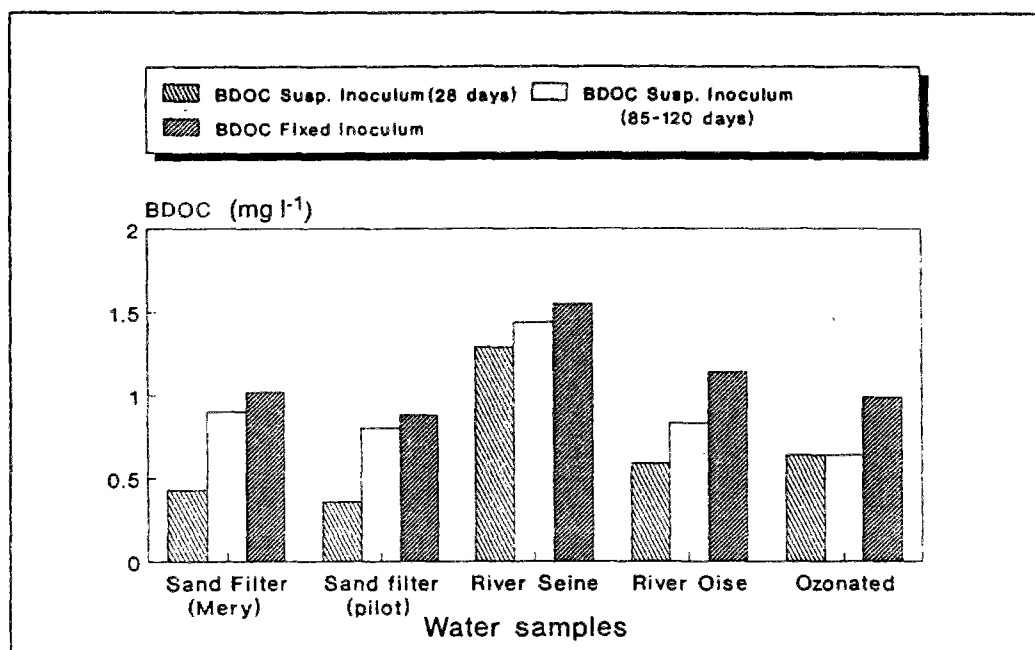


Figure 8: Influence of inoculum type (suspended inoculum: Susp. Inoculum; Fixed Inoculum (4 l h<sup>-1</sup> aeration)) and incubation period on BDOC measurements.

BDOC concentrations determined after 28 days increased by 100 - 125 % when the incubation time was extended to 85-120 days. For the two river water samples (River Seine water, River Oise water), the increase in determined BDOC concentration beyond 28 days was less pronounced (12 and 40%, respectively). For the ozonated water (containing easily biodegradable organic matter (7, 11)), biodegradation was complete after 28 days of incubation (no increase in the determined BDOC concentration was observed beyond 28 days).

### ***Effect of aeration.***

Three water samples inoculated either with fixed or suspended inocula were incubated with or without aeration (Table 1). For these water samples, a 4 l h<sup>-1</sup> aeration did not affect BDOC values measured with suspended bacteria, as opposed to the results obtained in the presence of fixed bacteria.

**Table 1:** BDOC values of water samples inoculated with fixed or suspended bacteria and with or without aeration.

| Water sample     | DOCi (mg l <sup>-1</sup> ) | B D O C (mg l <sup>-1</sup> ) |             |                              |             |
|------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
|                  |                            | Fixed inoculum                |             | Suspended inoculum           |             |
|                  |                            | 4 l h <sup>-1</sup> aeration  | no aeration | 4 l h <sup>-1</sup> aeration | no aeration |
| Ozonated water 1 | 3.10                       | 1.17                          | 0.60        | 0.43                         | 0.47        |
| Ozonated water 2 | 1.80                       | 0.72                          | 0.60        | 0.45                         | 0.47        |
| Settled water    | 4.00                       | 1.26                          | 0.90        | 0.66                         | 0.72        |

### 3) Comparison of BDOC values obtained with suspended or sand fixed bacteria.

Measured BDOC concentrations were always higher when using bacteria attached to sand (4 l h<sup>-1</sup> aeration) (Figure 8) (Table 1). For 30 water samples (river waters, partially treated waters and distributed waters), BDOC concentration was determined by the method using a suspended inoculum (28 day incubation period, no aeration) and by the technique using sand fixed bacteria (4 l h<sup>-1</sup> aeration) (Figure 9). A significant correlation ( $p=0.01$ ) between BDOC values obtained with a suspended or a fixed inoculum was found. The relationship was:

$$(II) \quad \text{BDOC}_{\text{susp.}} = 0.61 \text{ BDOC}_{\text{fix.}} - 0.05 \quad (r=0.93; n=30).$$

Intercalibration experiments between 2 laboratories (Université Libre de Bruxelles and our laboratory) showed that BDOC concentrations determined using fixed bacteria were two times higher than those measured with suspended bacteria (linear relationship:  $\text{BDOC}_{\text{susp.}} = 0.44 \text{ BDOC}_{\text{fix.}} + 0.04$ ;  $r=0.95$ ;  $n=17$ ) (internal report - Anjou Recherche).

Mathieu (16) observed also that BDOC values measured using bacteria attached to sand (with no aeration) were 1.2 - 1.5 times higher than those obtained with suspended bacteria.



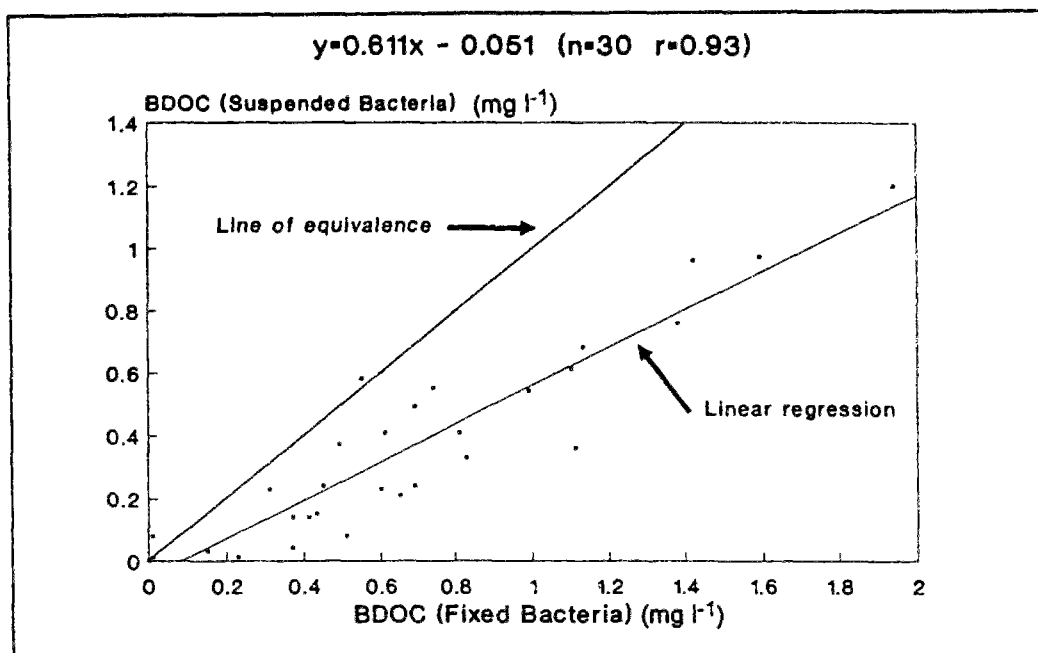


Figure 9: Relationship between BDOC values evaluated with suspended or sand fixed bacteria ( $4 \text{ l h}^{-1}$  aeration) for different water samples.

In order to understand this difference between BDOC concentrations determined by the two methods, the following experiment was performed: after BDOC determination in water samples incubated 28 days with suspended bacteria, remaining water samples were seeded with sand fixed inoculum ( $4 \text{ l h}^{-1}$  aeration) and incubated again (Figure 10).

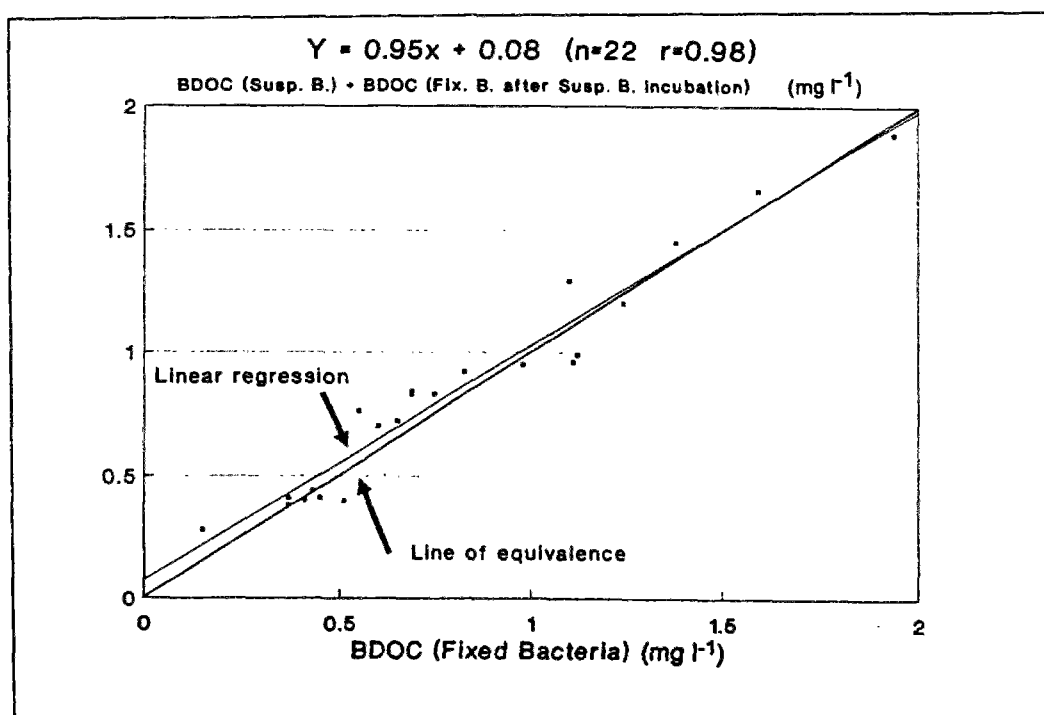


Figure 10: Relationship between BDOC values evaluated with sand fixed bacteria and sum of BDOC values measured successively with a suspended and then a fixed bacterial inoculum

The second incubation with bacteria attached to sand revealed an additional BDOC fraction. The sum of BDOC values measured successively with suspended and then fixed bacterial inoculum ( $\text{BDOC}_{\text{susp.}} + \text{BDOC}_{\text{fix. (after susp. incubation)}}$ ) corresponded to BDOC values obtained directly with bacteria fixed on sand ( $\text{BDOC}_{\text{fix.}}$ ). A significant correlation ( $p=0.01$ ) was observed. The linear relationship was :

$$(III) (\text{BDOC}_{\text{susp.}} + \text{BDOC}_{\text{fix. (after susp. incubation)}}) = 0.95 \text{ BDOC}_{\text{fix.}} + 0.08; r = 0.98; n = 22.$$

Two hypotheses could explain our observations:

- the bacterial concentration in freshly inoculated water samples was 100-1000 times higher when using colonized sand than when using river water as inoculum ( $10^7$  -  $10^8$  Bact.  $\text{g}^{-1}$  of sand;  $10^6$  Bact.  $\text{ml}^{-1}$  of river water). This difference in the inoculum size could affect the ratio ( $\text{So}/\text{Xo}$ ) between the initial substrate concentration ( $\text{So}$ ) and the initial bacterial concentration ( $\text{Xo}$ ).  $\text{So}/\text{Xo}$  ratio was found to affect batch biodegradation in experiments with mixed bacterial populations (18, 19, 20, 21).
- an attached inoculum might be able to degrade a larger range of organic compounds. Thus molecules that are refractory to biodegradation with a suspended inoculum could appear to be biodegradable by a fixed inoculum (Figure 10). This could be due to:
  - \* a greater bacterial diversity in the sand biofilm than in a river water,
  - \* a higher adaptation of sand bacteria. Fixed species are selected according to their ability to degrade a large spectrum of organic compounds,
  - \* an advantage due to the fixation. Fixed bacteria are more active than free bacteria, (because cometabolism, synergy mechanisms of consortia living in close association and development of an ecologic nest can occur on sand particles ).

BDOC concentrations determined by the method using bacteria fixed on sand are the sum of a DOC fraction really assimilated by bacteria and of a low DOC fraction adsorbed on the bacterial biofilm. The latter was assessed at about 0.1 - 0.2 mg per 100 g of sand (Figure 3). Biosorbed DOC fraction, of which assimilation is still unknown, could lead to an overestimation of BDOC.

The degradation of natural organic matter by suspended bacteria could be very long, especially concerning slowly biodegradable complex molecules. Indeed, it has been shown that when known concentrations of simple organic molecules (acetate, benzoate...) were added to mineral water (Evian water, France, DOC < 0.2 mg l<sup>-1</sup>), all of the added substrate was degraded just as well by a fixed inoculum within 2 days as by a suspended one within 2-4 days (unpublished data), but for slowly biodegradable compounds (pentaerythritol, para-nitrophenol), an adaptation of inocula was required for biodegradation of these molecules (21). Moreover, in this study, we have observed that for natural organic matter, biodegradation was generally uncomplete after a 28 day incubation. Out of five studied water samples, four showed a significant additional DOC removal when incubation was extended beyond 28 days (Figure 8).

Furthermore, for the 30 water samples of which BDOC content had been determined both with fixed bacteria (4 l h<sup>-1</sup> aeration) and with a suspended inoculum, we compared the biodegradation kinetics of the two methods. DOC removal was much faster when fixed bacteria were used than when water samples were seeded with suspended bacteria. Ninety per cent of the water samples inoculated with bacteria attached to sand reached a minimum DOC value within 8 days whereas for 85% of the water samples incubated in the presence of suspended bacteria, the minimum DOC value was observed after 15 days (data not shown). Mathieu (16) reported that biodegradation kinetics were faster when water samples were incubated with sand fixed bacteria. This author, studying 3 water samples, found that the minimum DOC values were obtained within 3 - 9 days and 17 -21 days when samples were incubated with sand fixed and suspended bacteria, respectively. The biodegradation kinetics with fixed bacteria was 2- 4 times faster than with suspended bacteria (fixed bacteria: 0.07 - 0.2 mg DOC l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; suspended bacteria: 0.03 - 0.05 mg DOC l<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>).

## Conclusions.

In this study, trials were performed in order to understand the significance of BDOC values obtained with methods using suspended or sand fixed inocula.

Concerning the BDOC determination using bacteria fixed on sand, inoculum size and aeration have been shown to affect the results of BDOC measurement. It results from our work that the experimental conditions most appropriate to obtain a rapid response and optimal biodegradation are a sand:water ratio of 100 g : 300 ml and an air flow of 2-4 l h<sup>-1</sup>.

Concerning the method using suspended bacteria, inoculum size (from 0.04 to 5 % v/v) and aeration (4 l h<sup>-1</sup>) seem to have no effect on BDOC determination. On the other hand, incubation time has been shown to affect the results of BDOC measurement. In this study, BDOC concentrations determined after 28 days of incubation increased by 0 - 125 % (depending upon the water type) when the incubation time was extended to 85 - 120 days.

Estimation of the BDOC concentration in a water sample depends on the applied method. During this work, BDOC contents measured with colonized sand were always higher than those measured with suspended bacteria. This phenomenon could be due to a greater ability of fixed bacteria to degrade the organic matter (bacterial diversity, adaptation of fixed bacteria to biodegradation...) and a low DOC adsorption on sand.

## Acknowledgements

The authors wish to thank J.C. Block (Faculté de Pharmacie, Nancy) and L. A. Kaplan (Stroud Water Research Center, Philadelphia) for their helpful comments on this manuscript.

## References

1. Allen M.J., Taylor R.H., and Geldreich E.E., The occurrence of microorganisms in water main encrustations. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, 72, 614-625 (1980).

2. Bouwer E.J., and Crowe P.B., Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **80**, 82-92 (1988).
3. Coallier J., Lafrance P., Duchesne D. and Lavoie D., La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable. *Sc. Tech. Eau*, **22**, 63 - 72 (1989).
4. Haudidier K., Paquin J.L., Francais T., Hartemann P., Grapin G., Colin F., Jourdain M.J., Block J.C., Cheron J., Pascal O., Levi Y. and Miazga J., Biofilm growth in drinking water network: a preliminary industrial pilot plant experiment. *Water Sci. Technol.*, **20**, 109-115 (1988).
5. Levy R.V., Hart F.L., and Cheetham R.D., Occurrences and public health significance of invertebrates in drinking water systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **78**, 105-110 (1986).
6. Le Chevallier M.W., Shulz W., and Lee R.G., Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**, 857-862 (1991).
7. Van der Kooij D., Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **84**, 57-65 (1992).
8. Huck P.M., Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth potential in drinking water: a review of methods and their application. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **82**, 78 - 86 (1990).
9. Van der Kooij D., Wisser A. and Hijnen W.A.M., Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **74**, 540 - 545 (1982).
10. Van der Kooij D. and Hijnen W.A.M., Substrate utilization by an oxalate consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 551 - 559 (1984).
11. Joret J.C. and Levi Y., Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, **39**, 3 - 9 (1986).
12. Joret J.C., Levi Y., Dupin T. and Gibert M., Rapid method for estimating bioeliminable organic carbon in water. In: *Proc. AWWA, annual Conf.*, June 19-23, 1988, Orlando, FL.
13. Joret J.C., Levi Y. and Gibert M., The measurement of biodegradable organic carbon (BDOC): a tool in water treatment. *Water Supply*, **7**, 41 - 45 (1989).

14. Servais P., Billen G. and Hascoet M.C., Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.*, **21**, 445 - 450 (1987).
15. Block J.C., Mathieu L., Servais P., Fontvieille D. and Werner P., Indigenous bacterial inocula for measuring the biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in waters. *Wat. Res.*, **24**, 481 - 486 (1992).
16. Mathieu L., Matière organique biodégradable et stabilité biologique des eaux au cours de leur distribution. In: *These de doctorat de l'Université de Nancy, mention Chimie et Microbiologie de l'eau* (1992).
17. Mogren E.M., Scarpino P. and Summers R.S., Measurement of biodegradable dissolved organic carbon in drinking water. In: *Proc. Annual AWWA Conf.*, June 18 - 24, 1990, Cincinnati, OH.
18. Chudoba P., Capdeville B. and Chudoba J., Explanation of biological meaning of the So/Xo ratio in batch cultivation. *Water Sci. Technol.*, **26**, 743-752 (1992).
19. Simkins S. and Alexander M., Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1299 - 1306 (1984).
20. Simkins S. and Alexander M., Non linear estimation of the parameters of Monod kinetics that best describe mineralization of several substrate concentrations by dissimilar bacterial densities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 816 - 824 (1985).
21. Thouand G. and Block J.C., Utilisation d'inocula précultivés dans les essais de biodégradabilité. *Environ. Technol.*, **14**, 601-614 (1993).



## La mesure du CODB : un index du potentiel de reviviscence bactérienne des eaux

The measurement of BDOC : an index of the bacterial  
regrowth potential in water

C. VOLK<sup>1</sup>, C. RENNER<sup>1</sup>, J.C. JORET<sup>1</sup>

Reçu le 12 novembre 1991, accepté pour publication le 24 août 1992\*.

### SUMMARY

Some attempts have been made to obtain an assessment of either the easily Assimilable Organic Carbon (AOC) or the total amount of Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) in drinking water.

The first approach was developed in several methods.

One of these methods consists of seeding pasteurized samples of water with pure cultures of bacteria (*Pseudomonas fluorescens* P17, P17 + *Spirillum* NOX). The growth of bacteria is monitored by a spread plate technique. AOC is expressed as equivalent amount of carbon ( $\mu\text{g C eq. acetate/l}$ ) by using known yield coefficients of these strains in acetate or in oxalate.

In the second approach, the BDOC content of water is evaluated by the reduction of Dissolved Organic Carbon (DOC) in a water sample incubated up to 30 days with suspended indigenous bacteria or 5-7 days with bacteria fixed on sand-particles.

This work was undertaken to determine the existing relationship between values of BDOC recorded by using fixed bacteria on sand and :

– the maximum growth of a pure strain of *Pseudomonas fluorescens* P17. Water samples (60 ml) were pasteurized and inoculated with a subculture of *Pseudomonas fluorescens* (initial concentration = 500 CFU/ml). The maximum growth at  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  was recorded by a pour plate method in PCA agar after 3-4 days of incubation.

– the maximum growth of strains P17 and NOX inoculated simultaneously in pasteurized water samples (40 ml) (500-1000 CFU/ml for each species). Each maximum growth at  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  after seven, eight and nine days of incubation was recorded (spread plate method on R2A agar) and converted in AOC (growth constants :  $4.1\text{ }10^6\text{ CFU per }\mu\text{g C}$  for P17,  $1.2\text{ }10^7\text{ CFU per }\mu\text{g C}$  for NOX).

1. Centre de recherche de la Compagnie générale des eaux, Chemin de la Digue, BP 76, 78600 Maisons Laffitte, France.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 juin 1993.



– the maximum growth of a mixed indigenous population of bacteria. Water samples (500 ml) were filtered (0,2  $\mu\text{m}$  filter) and reinoculated with one percent of river water. The maximum growth was recorded after 3-4 days of incubation at  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  by microscopic epifluorescent counts (acridin orange coloration).

Comparisons were done with different types of water including river water (Seine, Oise and Marne), partially treated water (conventional treatments), fully treated water, ground water, mineral water and distilled water.

The study has demonstrated :

– a poor correlation ( $r = 0.716$  ;  $n = 28$ ) between BDOC values and the maximum growth of *Pseudomonas fluorescens*. This observation can be explained by the limited spectrum of activity and the low affinity of *Pseudomonas fluorescens* for organic molecules. Under these conditions, the growth yield was  $5.9 \cdot 10^8$  CFU per mg C (BDOC).

– a better correlation ( $r = 0.850$  ;  $n = 31$ ) between BDOC and the maximum growth of P17 for water samples seeded simultaneously with P17 and NOX. Under these conditions, no correlation ( $r = 0.264$  ;  $n = 31$ ) was found between values of BDOC and maximum growth of NOX, demonstrating varying affinities of the NOX strain for ozonation by-products. In spite of this limit, the relation between BDOC and AOC values remained relatively good ( $r = 0.769$  ;  $n = 31$ ) with a factor of conversion of 1 mg BDOC for 90  $\mu\text{g}$  C eq. acetate.

– a significative correlation ( $r = 0.943$  ;  $n = 30$ ) between values of BDOC (fixed bacteria on sand) and the maximum growth of indigenous bacteria by direct microscopic examination epifluorescent counts. The growth yield was then  $1,7 \cdot 10^9$  cells per mg of BDOC.

In conclusion, the rapid estimation of BDOC by the technique using indigenous bacteria fixed on sand particles can be considered as a good predictor of the potential bacteria regrowth for different types of water.

**Key-words :** Biodegradable Organic Matter, Biodegradable Dissolved Organic Carbon, Assimilable Organic Carbon, Regrowth, *Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* NOX, Natural mixed culture of bacteria.

## RÉSUMÉ

La mesure de la matière organique biodégradable dans l'eau est déterminée à partir de tests biologiques qui reposent sur deux concepts.

Le premier est basé sur le suivi de la croissance de souches pures ou d'une population bactérienne mixte dans un échantillon d'eau. Le maximum de croissance obtenu est converti en Carbone Organique facilement Assimilable (COA) et exprimé en  $\mu\text{g}$  de C eq. acétate/l en tenant compte du rendement de croissance de ces bactéries dans des solutions d'acétate de sodium.

Le second repose sur le suivi de la décroissance du Carbone Organique Dissous (COD) dans un échantillon d'eau ensemencé par une flore bactérienne indigène des eaux (flore en suspension ou flore fixée sur des particules de sable). La matière organique biodégradée est exprimée sous forme de Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB).

Des essais ont été réalisés sur différents types d'eau (eaux de rivière de la Seine, de l'Oise et de la Marne, eaux en cours de traitement de potabilisation, eaux distribuées et eaux distillées) afin de mettre en évidence la relation existant entre la mesure du CODB en présence de bactéries fixées sur du sable et le maximum de croissance bactérienne enregistré dans les mêmes échantillons stérilisés puis réensemencés par des souches pures (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX) ou par un inoculum mixte de bactéries indigènes de l'eau.

Les résultats de cette étude mettent en évidence :

- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Pseudomonas fluorescens* P17) médiocre ( $r = 0,716$  ;  $n = 28$ ) pour des échantillons d'eauensemencés par *Pseudomonas fluorescens* P17 seul (dénombrement en gélose) ;
- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Pseudomonas fluorescens* P17) améliorée ( $r = 0,850$ ,  $n = 31$ ) pour des échantillonsensemencés simultanément avec un mélange de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX (dénombrement en gélose) ;
- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Spirillum* NOX) très faible ( $r = 0,264$  ;  $n = 31$  ; corrélation non significative) pour des échantillonsensemencés simultanément avec un mélange de P17 + NOX (dénombrement en gélose) ;
- le coefficient de corrélation entre le CODB et le COA (*Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX) est de 0.769 ( $n = 31$ ) avec une équivalence de 140  $\mu\text{g}$  de COA (eq. acétate) par mg de CODB lorsque P17 est utilisé isolément et 90  $\mu\text{g}$  de COA (eq. acétate) par mg de CODB lorsque P17 et NOX sont utilisés simultanément ;
- la relation entre le CODB et le maximum de croissance (flore naturelle mixte) est par contre très satisfaisante ( $r = 0,943$  ;  $n = 30$ ) lorsque les dénombrements bactériens sont effectués par microscopie en épifluorescence (coloration à l'acridine orange).

Le rendement de croissance est alors de  $1,7 \cdot 10^9$  cellules pour 1 mg de CODB mesuré en présence de sable biologique.

En conclusion, la mesure du CODB au moyen de bactéries fixées, originellement décrite pour évaluer l'efficacité des filières de traitement de potabilisation vis-à-vis de l'élimination de la Matière Organique Biodégradable permet aussi de prédire le potentiel de recroissance bactérienne (bactéries indigènes) de différents types d'eau.

**Mots clés :** Matière Organique Biodégradable, Carbone Organique Dissous Biodégradable, Carbone Organique Assimilable, Recroissance, *Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* NOX, Flore bactérienne mixte.

## INTRODUCTION

Le phénomène de reviviscence bactérienne entraînant une diminution de la qualité bactériologique de l'eau, l'apparition de goûts, d'odeurs ou de couleurs ainsi que l'accélération des processus de corrosion est lié à la présence d'un biofilm, sur la paroi des canalisations. Sa densité peut atteindre  $10^9$  bactéries par  $\text{cm}^2$  (OLSON, 1982).

Les bactéries présentes dans le biofilm semblent particulièrement protégées de l'action des désinfectants tels que le chlore ou les chloramines. En effet, des taux élevés de l'ordre de 1 à 5 mg/l de résiduel de chlore libre ne pénètrent pas en totalité le biofilm (LECHEVALLIER *et al.*, 1988). Sous l'effet conjugué ou non des désinfectants et des forces de friction hydraulique du réseau, des bactéries peuvent se décrocher du biofilm. Ceci entraîne une augmentation du nombre de germes hétérotrophes et dans certains cas, l'appari-

tion de coliformes (COALLIER *et al.*, 1989 ; JORET *et al.*, 1990 ; LE CHEVALLIER *et al.*, 1989). Des résiduels de chlore importants peuvent, dans certaines conditions, inactiver la contamination bactérienne de l'eau de distribution par ces bactéries en suspension. Cependant l'utilisation de doses excessives de désinfectants peut entraîner la formation de sous produits organochlorés de toxicité mal connue et l'apparition de goûts désagréables (COALLIER *et al.*, 1989).

Les principaux facteurs influençant la reviviscence sont la température, l'âge et la nature des canalisations, l'éloignement de l'usine de traitement, le temps de résidence et la vitesse de l'eau, l'efficacité de la désinfection et la présence de nutriments. La fraction biodégradable de la matière organique est, en effet, un élément important dans la recroissance bactérienne. La matière organique est composée d'acides humiques et fulviques, d'acides carboxyliques, d'acides aminés et de protéines, d'hydrates de carbone et d'éléments à l'état de traces. Du fait de sa faible concentration et de la multitude de ses constituants, l'évaluation de la matière organique biodégradable est impossible par les techniques de chimie classiques.

Il a été démontré que la mesure du Carbone Organique Total (COT) n'est pas un bon indicateur de la recroissance bactérienne (RIZET *et al.*, 1982). Différents tests biologiques visant à évaluer la quantité de matière organique biodégradable ont été mis au point. Ils sont basés sur deux principes :

Le premier repose sur le suivi de la croissance de souches pures ou d'une flore bactérienne mixte dans un échantillon d'eau. Cette approche a été décrite par différents auteurs.

La première méthode consiste à ensemencer un échantillon d'eau avec un mélange de souches pures de bactéries (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* NOX, *Flavobacterium*...) (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1981) (VAN DER KOOIJ *et al.*, 1982) (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984). La croissance est suivie par dénombrement bactérien sur gélose. L'indice de biodégradabilité des eaux est transformé en Carbone Organique facilement Assimilable (COA) et exprimé en  $\mu\text{g C eq. acétate par litre}$ . Cette valeur de COA est déterminée à partir du maximum de croissance après calcul du rendement de croissance des bactéries dans des solutions d'acétate ou d'oxalate. Les mesures de COA enregistrées sur des eaux potables sont très basses (quelques  $\mu\text{g C/l}$ ) et ne représentent qu'une très faible fraction ( $< 1 \%$ ) du Carbone Organique Total (COT) (VAN DER KOOIJ *et al.*, 1982).

Dans un souci de simplification, la méthode a été modifiée et proposée pour standardisation (KAPLAN et BOTT, 1989) (KAPLAN et BOTT, 1990) (Supplement Standard Methods, 1991).

Deux variantes de cette approche visant à déterminer le COA ont été développées au Royaume-Uni : KEMMY *et al.* (1989) utilisent un mélange de quatre souches sélectionnées avec un rendement de croissance obtenu sur un mélange standard de composés organiques.

STANFIELD et JAGO (1987) (JAGO et SHARP, 1988) ensemencent l'eau par une flore bactérienne mixte naturelle. La croissance cellulaire est suivie par mesure de l'ATP.

Enfin, deux méthodes visant à évaluer le potentiel de recroissance bactérienne de différents types d'eau ont été décrites.

Une méthode est basée sur l'enregistrement en continu de la cinétique de croissance d'un inoculum naturel mixte par mesure de la turbidité (WERNER, 1985) (WERNER et HAMBSCH, 1986). Deux paramètres sont retenus. L'évaluation du taux de croissance ( $\mu$ ) pendant la phase exponentielle de croissance renseigne sur la plus ou moins grande biodégradabilité du substrat, tandis que le rendement de croissance ( $\log y/y_0$ ) traduit l'augmentation de la population bactérienne pendant la durée de l'expérience. Une autre méthode vise à déterminer spécifiquement l'aptitude d'une eau à favoriser le potentiel de recroissance des coliformes (REASONNER et RICE, 1989).

La seconde approche a été développée par des chercheurs travaillant avec la Compagnie Générale des Eaux. La matière organique biodégradable est exprimée sous forme de Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB). Ce paramètre est évalué par la réduction du Carbone Organique Dissous (COD) dans un échantillonensemencé par une flore bactérienne mixte indigène de l'eau, et incubé pendant 30 jours (SERVAIS *et al.*, 1987). Les valeurs de CODB enregistrées sont en parfaite correspondance avec les valeurs de matière organique biodégradée estimées à partir de la biomasse produite et du flux de mortalité bactérienne dans l'échantillon pendant cette même période d'incubation.

Les valeurs de CODB représentent de 10 à 30 % du COD total, pour des eaux de distribution ou en cours de traitement (SERVAIS *et al.*, 1987). Les concentrations qui correspondent à la partie minéralisée de la matière organique par les bactéries sont exprimées en mg C/l. Cette technique permet, par ailleurs, de connaître la quantité de Carbone Organique Dissous Réfractaire à la biodégradation dans l'échantillon (CODR). Cette technique a été modifiée et simplifiée afin de la rendre plus rapide (JORET et LEVI, 1986 ; JORET *et al.*, 1988 ; JORET *et al.*, 1989, JORET *et al.*, 1990). Cette technique est basée sur la décroissance du COD dans un échantillon d'eau inoculé par des bactéries fixées sur du sable (provenant d'un filtre à sable traitant une eau non préchlorée). La réponse est obtenue après 5-7 jours d'incubation du fait d'une population bactérienne abondante.

Les temps d'incubation peuvent être diminués grâce à un système en dynamique de recirculation de l'eau sur le sable (MOGREN *et al.*, 1990) ou par percolation lente de l'eau sur une colonne remplie d'un support colonisé par des bactéries (RIBAS *et al.*, 1991).

Le but de ce travail était d'évaluer la relation existant entre la mesure du CODB en présence de sable biologique et le potentiel de recroissance bactérienne de différents types d'eau (eaux de rivière, eaux en cours de traitement de potabilisation, eaux distribuées, eaux minérales et eaux distillées) évalué en utilisant :

- la recroissance d'une souche pure de *Pseudomonas fluorescens* P17 ;
- la recroissance de deux souches pures (P17 + *Spirillum* NOX). La recroissance des souches pures sera évaluée par dénombrement sur milieu gélosé ;
- la recroissance d'une flore bactérienne mixte indigène des eaux mesurée par comptage microscopique en épifluorescence après coloration à l'acridine orange. Le dénombrement en milieu gélosé ne révélant qu'une petite partie d'une flore bactérienne naturelle mixte.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Préparation de la verrerie

L'ensemble de la verrerie est chauffé à 550 °C pendant 4 heures afin d'éliminer toute trace de contamination carbonée.

### Préparation des précultures de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX

A partir d'une gélose R2A, une colonie est repiquée dans 10 ml d'eau distillée autoclavée. La suspension bactérienne est incubée une semaine à 20 °C jusqu'à ce que la culture atteigne un état stationnaire. Les cultures en phase stationnaire sont ensuite stockées à 4 °C. Leur concentration bactérienne est comprise entre  $10^6$  et  $10^7$  UFC/ml (dénombrement sur milieu gélosé).

### Suivi de la croissance bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* P17

Les expériences sont réalisées en duplicat. Dans un flacon de 100 ml à bouchon en verre rodé, 60 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sont pasteurisés (70 °C pendant 30 mn) puis inoculés à partir des précultures de *Pseudomonas fluorescens* à raison de 500 UFC/ml environ. Les échantillons sont incubés à 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant 10 jours. Les dénombrements sont réalisés quotidiennement sur une gélose PCA (DIFCO), après ensemencement par inclusion de 1 ml d'échantillon pur ou dilué dans de l'eau distillée stérile. Les boîtes de dénombrement sont incubées 3 jours à 20 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Les lectures sont effectuées sur les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC/ml.

### Suivi de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX.

La technique utilisée est la méthode standardisée par Kaplan (Supplement Standard Methods, 1991). Les échantillons d'eau déchlorés (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'eau) sont répartis dans 10 flacons de culture de 40 ml en verre (bouchon avec septum recouvert de téflon). Ils sont pasteurisés (70 °C pendant 30 mn) puis inoculés avec une seringue tuberculinique successivement par une préculture de P17 et de NOX à raison de 500 à 1000 UFC/ml en concentration finale pour chaque souche. Les flacons sont incubés à 20 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Au septième, huitième et neuvième jour, 3 ou 4 flacons de culture sont prélevés, et agités vigoureusement. Pour chaque échantillon, une série de dilutions dans l'eau distillée stérile est réalisée. Les dénombrements sont effectués sur 100  $\mu\text{l}$  des dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  après étalement sur gélose R2A (DIFCO). Les boîtes de

dénombrement sont incubées 3 à 5 jours à 20 °C ( $\pm 1$  °C). Les colonies de P17 et NOX sont comptées séparément, P17 formant des colonies de 3 à 4 mm de diamètre avec un halot de pigmentation jaune, NOX donnant des colonies bombées blanches de 1 à 2 mm de diamètre.

Le nombre maximum d'UFC/ml (N max) pour chaque jour est défini par la moyenne des valeurs obtenues dans 3 ou 4 flacons d'eau.

Le maximum de croissance est défini comme la moyenne des valeurs d'UFC/ml, au niveau du plateau de la courbe de croissance après 7, 8 et 9 jours d'incubation.

La conversion en COA est effectuée avec un rendement de croissance de  $4,1 \cdot 10^6$  UFC/ $\mu$ g C pour P17 et de  $1,2 \cdot 10^7$  UFC/ $\mu$ g C pour NOX (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984) selon les formules suivantes :

$$\text{COA P17 } \mu\text{g C/l} = \frac{(\text{moyenne N max P17 (J7+J8+J9)})}{(\text{UFC/ml})} \cdot \frac{1}{(\text{UFC}/\mu\text{g eq. acétate})} \times 1000$$

$$\text{COA NOX } \mu\text{g C/l} = \frac{(\text{moyenne N max NOX (J7+J8+J9)})}{(\text{UFC/ml})} \cdot \frac{1}{(\text{UFC}/\mu\text{g C eq. acétate})} \times 1000$$

$$\text{COA total} = \text{COA P17} + \text{COA NOX}$$

### Suivi de la croissance d'une flore mixte

Les expériences sont réalisées en duplicat.

500 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sont filtrés sur membranes de porosité de 0,2  $\mu$ m (membrane en polycarbonate Nucléopore, diamètre = 47 mm), puisensemencés par 5 ml d'une eau de Seine préfiltrée sur membrane de porosité de 2  $\mu$ m (membranes en polycarbonate Nucléopore, diamètre = 47 mm).

Les échantillons sont incubés à 20 °C pendant 28 jours. Le dénombrement bactérien est effectué par comptage microscopique en épifluorescence après coloration à l'acridine orange. 1 ml d'échantillon pur ou dilué est filtré (membrane noire en polycarbonate, Millipore, porosité = 0,2  $\mu$ m, diamètre = 25 mm). Les bactéries retenues sur la membrane sont mises en contact pendant 10 mn avec une solution d'acridine orange (MERCK Ref 1333) à 30  $\mu$ g/ml. Les cellules sont comptées au microscope (Leitz, Dialux 20) sous excitation UV (lampe ORSAM HBO 50 W). Après dénombrement des bactéries (lecture de 20 champs répartis sur toute la membrane), le résultat est exprimé en nombre de bactéries/ml.

### Mesure du CODB en présence de bactéries fixées sur du sable

300 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sontensemencés par 100 g de sable biologique et incubés à 20 °C ( $\pm 1$  °C) avec une aération de 4 l/h selon la méthode décrite par JORET et LEVI (1986).

Tous les jours, une mesure du COD est effectuée en duplicat à l'aide d'un analyseur de Carbone Organique Total (Oceanic Instrument Analytical, modèle 700). L'échantillon est acidifié par 400 µl d'acide orthophosphorique à 5 % afin d'éliminer les bicarbonates. Le carbone organique est oxydé par addition de 1 ml de persulfate de sodium (100 g/l) à chaud pour une prise d'échantillon de 5 ml. Le COD est évalué par mesure du CO<sub>2</sub> produit détecté par spectrométrie infrarouge.

Le CODB correspond à la différence entre la valeur de COD initiale (CODi) et la valeur minimale (CODR) obtenue après quelques jours d'incubation.

$$\text{CODB mg/l} = \text{CODi} - \text{COD minimal}$$

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Relation entre CODB et maximum de croissance d'une souche pure de *Pseudomonas fluorescens* P17

Ces deux paramètres ont été comparés pour différentes dilutions d'un échantillon d'eau de Seine (CODi = 3,24 mg/l ; CODB = 1,37 mg/l). Ces dilutions (1/4, 1/2 et 3/4) ont été effectuées dans de l'eau ultrapure (Système de purification MILLI-Q, Millipore).

La figure 1 montre la relation entre les maxima de croissance et les valeurs de CODB pour les différentes dilutions de cet échantillon. Elle indique une bonne corrélation ( $r = 0,989$ ) entre les deux méthodes analytiques utilisées en fonction de la dilution d'une eau de rivière.

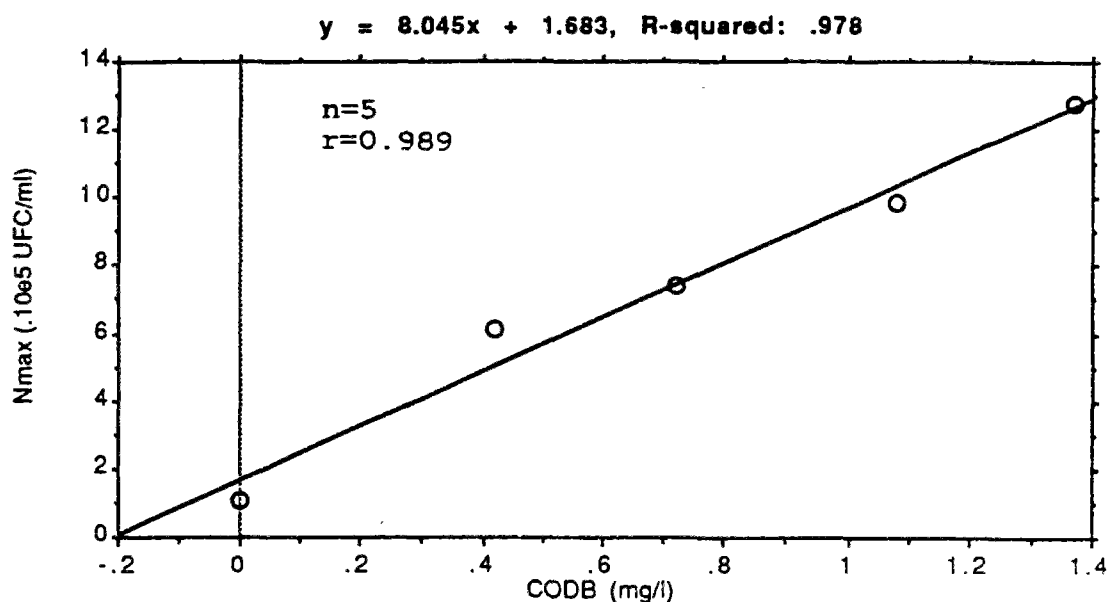
L'étude a été poursuivie sur différents types d'eau (eaux de rivières, eaux en cours de traitement de l'usine de Méry sur Oise, eaux produites, eaux minérales, eaux distillées) (fig. 2).

Pour les eaux de rivières, les valeurs de CODB sont supérieures à 1,2 mg/l (CODi compris entre 3,10 et 4,03 mg/l) avec des valeurs du maximum de croissance de P17 supérieures à  $7 \cdot 10^5$  UFC/ml.

Les eaux potables ou en cours de traitement présentent des valeurs de CODB qui varient de 0,2 mg/l jusqu'à 1 mg/l (CODi compris entre 0,90 et 2,89 mg/l). Les maxima de croissance de P17 sont compris entre  $2 \cdot 10^5$  et  $8 \cdot 10^5$  UFC/ml.

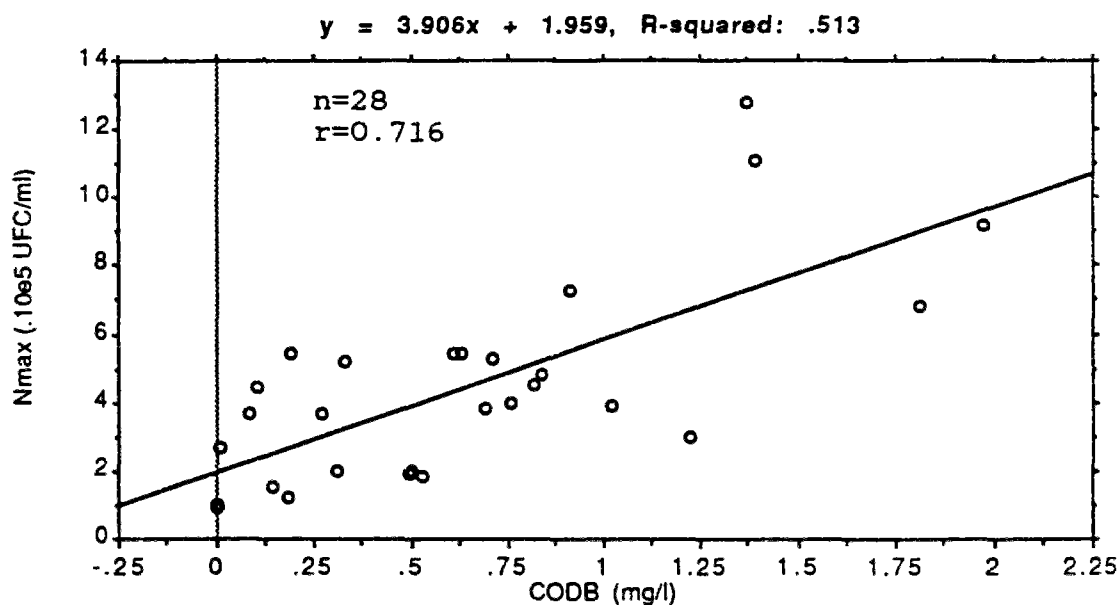
Pour les eaux pauvres en matière organique (CODi inférieur à 0,5 mg/l, CODB inférieur à 0,1 mg/l), les maxima de croissance sont compris entre  $0,9 \cdot 10^5$  UFC/ml (eau distillée) à  $2 \cdot 10^5$  UFC/ml (eau minérale).

Pour les 28 échantillons étudiés, les valeurs de CODB et les maxima de croissance de *Ps. fluorescens* P17 sont statistiquement liés ( $p = 0,01$ ). Cependant le coefficient de corrélation est médiocre ( $r = 0,716$ ). Pour des



**Figure 1** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose PCA ensemencée en inclusion) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : *Pseudomonas fluorescens* P17.

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, pour plate method, PCA medium) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : Pseudomonas fluorescens P17.*



**Figure 2** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose PCA ensemencée en inclusion) pour différents types d'eau. Inoculum : *Pseudomonas fluorescens* P17.

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, pour plate method, PCA medium) for different types of water. Inoculum : Pseudomonas fluorescens P17.*



eaux de diverses origines, l'observation du maximum de croissance de la souche de P17 ne traduit que dans 50 % des cas ( $r^2 = 0.513$ ) les variations de CODB enregistrées. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette souche de bactéries ne peut assimiler qu'un spectre limité de substrats, lesquels peuvent être présents en quantité très variable dans les différents échantillons d'eau.

D'après la pente de la droite, le rendement de croissance moyen de la souche de *Ps. fluorescens* P17 peut être estimé à  $5,9 \cdot 10^8$  UFC par mg de CODB.

Le rendement de croissance de P17 en présence d'acétate de sodium étant de  $4,1 \cdot 10^6$  UFC/ $\mu\text{g C eq. acétate}$  (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984), il en résulte que 1 mg de CODB mesuré en présence de sable biologique correspond en moyenne au cours de ces essais à une valeur de COA de 140  $\mu\text{g C eq. acétate}$ .

#### **Relation entre le CODB, la croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX et le COA.**

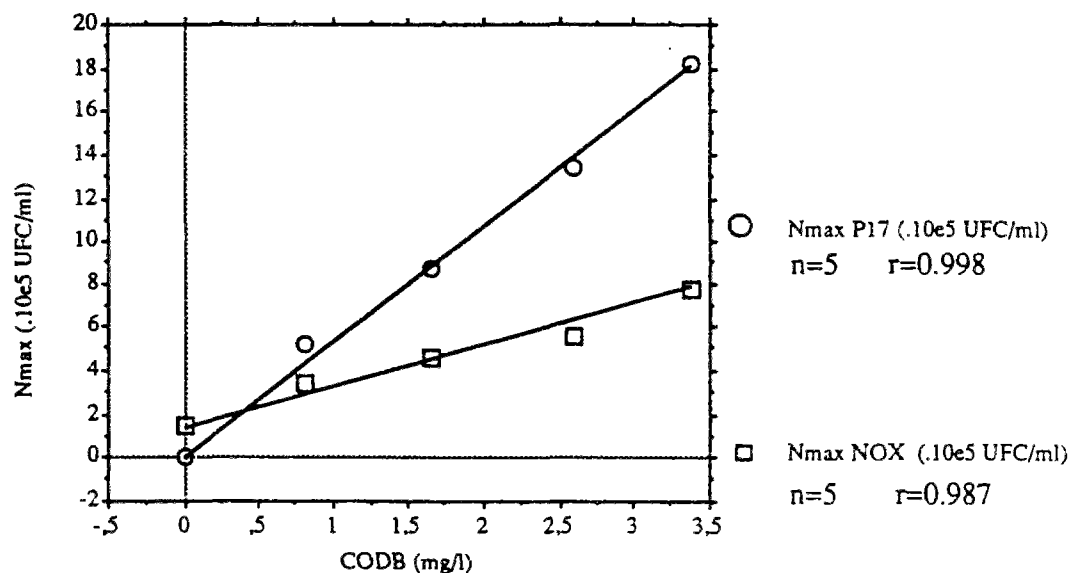
La relation existant entre les valeurs de CODB et le maximum de croissance de chacune des souches de P17 et NOX lorsque les échantillons d'eau sontensemencés simultanément par ces deux souches bactériennes a été étudiée.

Pour différentes dilutions d'un échantillon d'eau de rivière (CODi = 5.60 mg/l ; CODB = 3,38 mg/l) dans de l'eau ultrapure (Système de purification MILLI-Q, Millipore) les valeurs de CODB sont en étroite corrélation avec les maxima de croissance obtenus pour chacune des souches de *Ps. fluorescens* P17 ( $r = 0,998$ ) et de *Spirillum* NOX ( $r = 0,987$ ) (fig. 3). Dans ces conditions, le calcul des valeurs de COA à partir des maxima de croissance conduit à une très bonne corrélation entre COA et CODB (fig. 4) en fonction de la dilution d'une eau de rivière ( $r = 0,996$  ;  $n = 5$ ).

La différence de pente des droites de croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 incubé seul (fig. 1 ;  $y = 8,045 x + 1.683$ ) ou en présence de *Spirillum* NOX (fig. 3 ;  $y = 5,204 x + 0,350$ ) traduit la compétition entre P17 et NOX vis-à-vis de la matière organique biodégradable quand ils sont incubés simultanément.

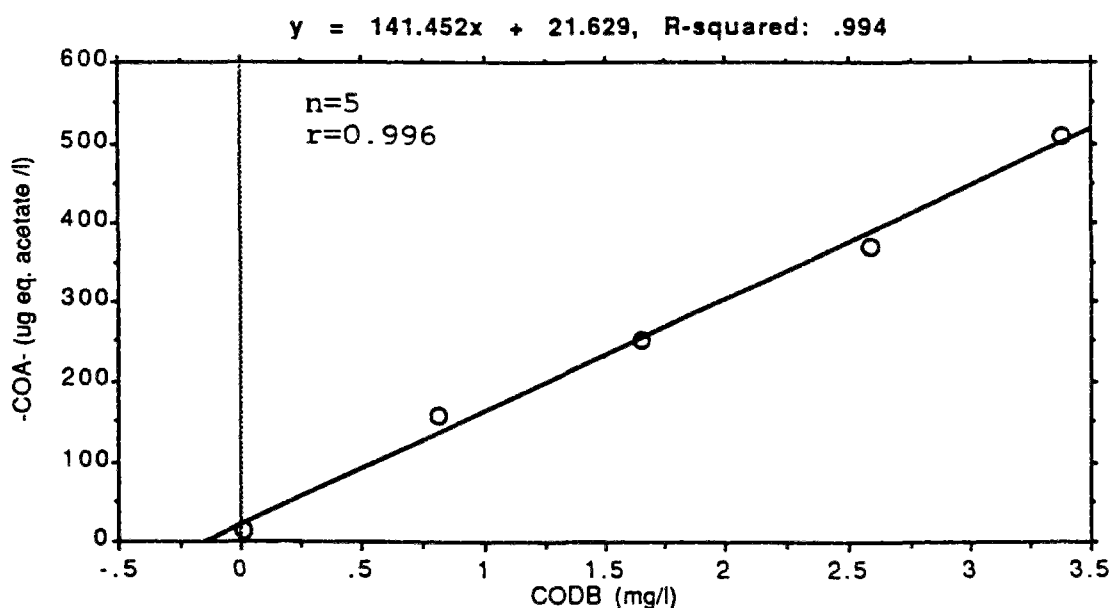
La même approche a été effectuée pour des eaux d'origines diverses (eaux de rivières avec des valeurs de CODi de 3,12 à 4,42 mg/l ; CODB compris entre 1,05 et 2,08 mg/l), des eaux en cours de traitement de potabilisation (CODi compris entre 1,49 et 3,58 mg/l ; CODB compris entre 0,34 et 1,32 mg/l), des eaux distribuées (CODi compris entre 0,38 et 2,25 mg/l ; CODB compris entre 0,1 et 0,9 mg/l), des eaux minérales (CODi compris entre 0,30 et 0,53 mg/l ; CODB inférieur à 0,15 mg/l) et des eaux distillées (CODi inférieur à 0,20 mg/l ; CODB inférieur à 0,1 mg/l).

La relation entre les valeurs du maximum de croissance de *Ps. fluorescens* P17 et les valeurs de CODB est représentée sur la figure 5. Les valeurs de CODB et maxima de croissance sont statistiquement liées ( $p = 0,01$ ). Le coefficient de corrélation obtenu ( $r = 0,850$  ;  $n = 31$ ) est meilleur que lors des



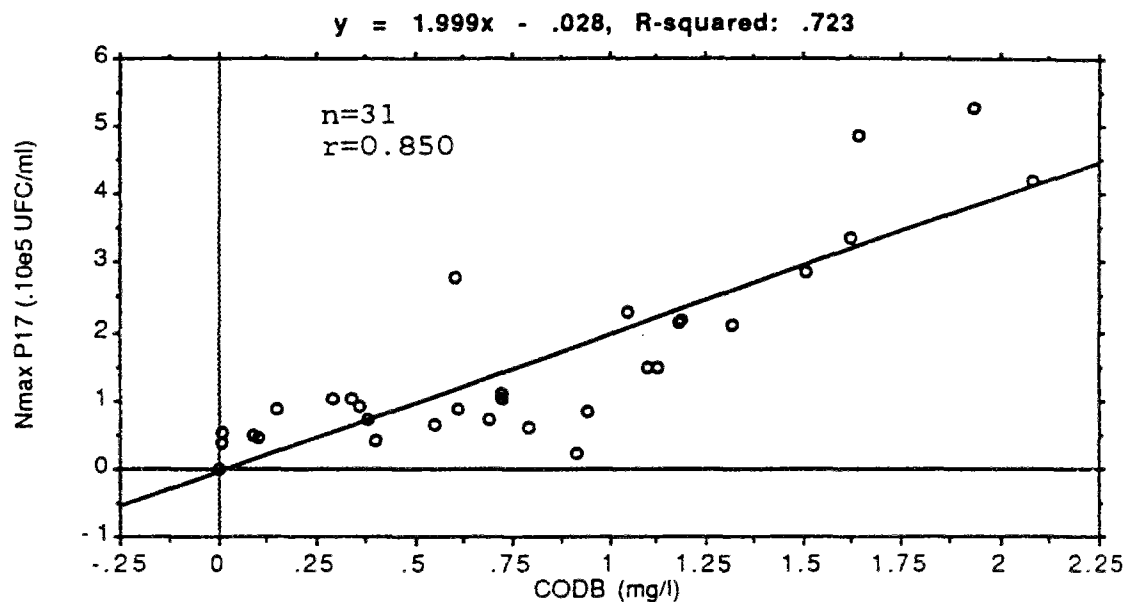
**Figure 3** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 (○) et de *Spirillum* NOX (□) (UFC/ml, gélose R2A ensemencée en surface) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : P17 + NOX.

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth of Pseudomonas fluorescens P17 (○) and Spirillum NOX (□) (CFU/ml, spread plate method, R2A medium) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : P17 + NOX.*



**Figure 4** Relation entre le CODB (sable biologique) et le COA (μg C eq. acétate/l) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : P17 + NOX.

*Relationship between BDOC (sand) and AOC (μg C eq. acetate/l) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : P17 + Nox.*



**Figure 5** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose R2A ensemencée en surface) de *Pseudomonas fluorescens* P17 dans différents types d'eau. Inoculum : P17 + NOX.

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, spread plate method, R2A medium) of Pseudomonas fluorescens P17 for different types of water. Inoculum : P17 + NOX.*

essais précédents (ensemencement des échantillons par P17 seul). Cela peut traduire la capacité de la souche P17 à utiliser des sous produits de biodégradation de la souche NOX. Il faut toutefois noter que dans ces conditions expérimentales, le rendement de croissance n'est que de  $2,0 \cdot 10^8$  UFC par mg de CODB contre  $5,9 \cdot 10^8$  UFC par mg de CODB lorsque cette souche est ensemencée isolément dans les échantillons d'eau. Ces résultats sont l'expression du phénomène de compétition pour le substrat entre les deux souches bactériennes. Par ailleurs, on note une discontinuité des maxima de croissance de part et d'autre de la valeur de 0,70 mg/l de CODB.

En ce qui concerne la relation obtenue entre les valeurs de maximum de croissance de *Spirillum* NOX et les valeurs du CODB (fig. 6), le coefficient de corrélation sur ces mêmes types d'eau est très faible ( $r = 0,264$  ;  $n = 31$  ; valeurs de CODB et maxima de croissance de NOX statistiquement indépendantes ( $p = 0,01$ )). La dispersion des points est à l'évidence principalement liée aux échantillons d'eau ayant subi une étape d'ozonation (fig. 6). La corrélation étant meilleure pour les échantillons non ozonés ( $r=0,915$  ;  $n=19$ ), la bactérie *Spirillum* NOX semble donc avoir une affinité très variable selon la nature des sous produits d'ozonation. L'utilisation de cette bactérie préconisée pour évaluer la biodégradabilité des eaux après ozonation (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984) semble donc présenter des limites, particulièrement pour ce type d'eau.

Les valeurs cumulées des maxima de croissance de P17 et NOX et les valeurs de CODB sont liées ( $p = 0,01$ ), mais le coefficient de corrélation est assez faible ( $r = 0,510$  ;  $n = 31$ ).

Une meilleure relation ( $r = 0,769$  ;  $n = 31$ ) est par contre obtenue lorsque l'on exprime les valeurs de CODB et de COA (fig. 7). Ces deux paramètres varient de la même manière dans 60 % des cas.

D'après la pente de la droite, 1 mg de CODB correspond alors à 90  $\mu\text{g}$  C eq. acétate ( $r^2 = 0,592$ ). Sa valeur est proche de celle obtenue lorsque les échantillons d'eau sontensemencés avec *Ps. fluorescens* P17 seul (140  $\mu\text{g}$  eq. acétate ;  $r^2 = 0,513$ ).

### Relation entre CODB et recroissance d'une flore bactérienne mixte

La figure 8 montre la relation entre les valeurs de maximum de croissance d'une flore bactérienne mixte et les valeurs de CODB pour différentes dilutions d'eau de rivière (CODi = 3,24 mg/l ; CODB = 1,23 mg/l) dans de l'eau ultrapure. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0,984.

L'étude sur des eaux de différentes origines est montrée dans la figure 9.

Les eaux de rivières (CODi compris entre 2,69 et 4,04 mg/l ; CODB supérieur à 1 mg/l) ont un maximum de croissance supérieur à  $2 \cdot 10^6$  bactéries/ml.

En ce qui concerne les eaux en cours de traitement et les eaux potables (CODi compris entre 1,05 et 3,00 mg/l ; CODB compris entre 0,10 et 1,10 mg/l), les maxima de croissance varient de  $5 \cdot 10^5$  à  $1,5 \cdot 10^6$  bactéries/ml.

Pour les eaux pauvres en matière organique, le maximum de croissance se situe entre  $3,5$  et  $5 \cdot 10^5$  bactéries/ml (CODi inférieur à 0,5 mg/l ; CODB inférieur à 0,1 mg/l).

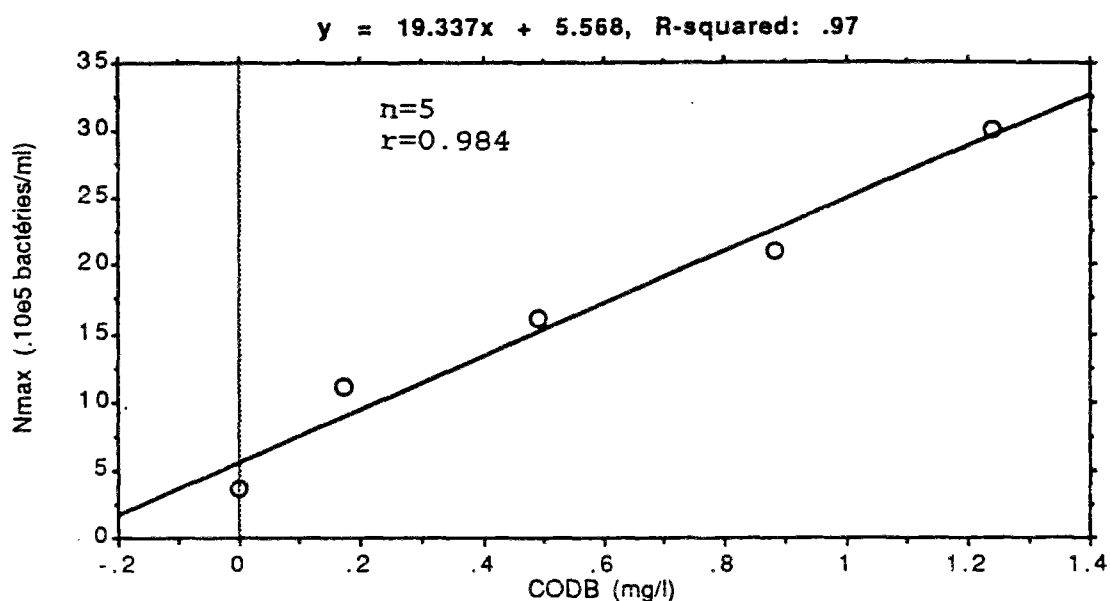
La relation entre les deux paramètres, CODB et maximum de croissance, est alors très bonne ( $r = 0,943$  ;  $n = 30$ ). Ces résultats démontrent que le CODB prédit à 90 % la recroissance d'une flore bactérienne mixte, celle-ci étant capable d'utiliser un plus large spectre de composés organiques que des souches pures, utilisées seules ou en mélange. Le rendement de croissance est de  $1,7 \cdot 10^9$  bactéries/mg de CODB soit trois fois plus important que celui de *Ps. fluorescens* seul.

### CONCLUSION

Le test biologique d'évaluation du CODB faisant appel à des bactéries fixées sur du sable est une technique simple, rapide et facile à mettre en œuvre. Il ne nécessite pas de dénombrements bactériens fastidieux.

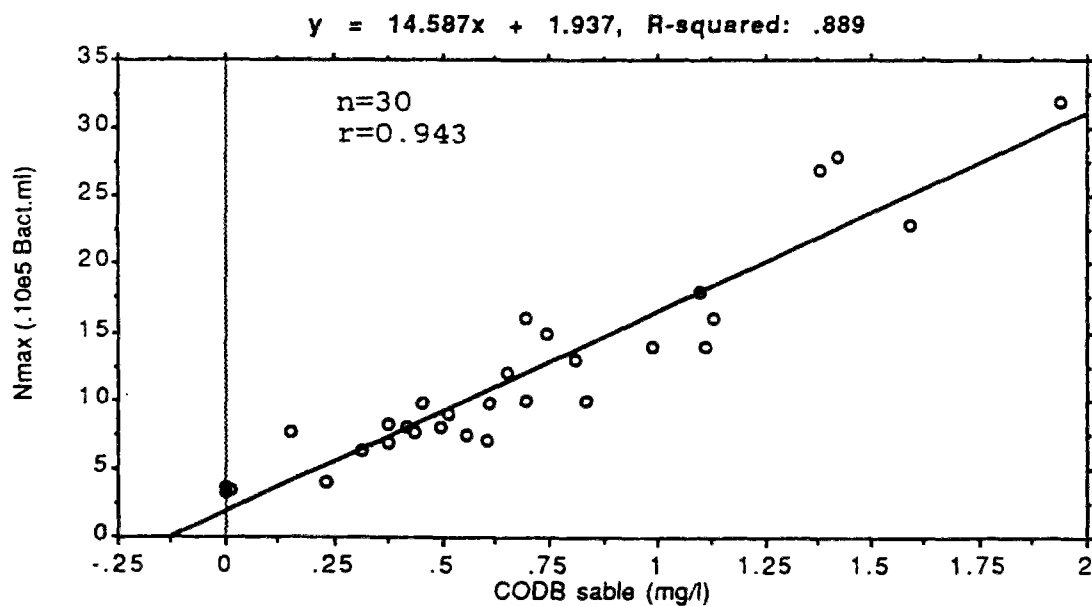
Cette méthode donne une information quantitative précieuse sur les fractions biodégradables et réfractaires à la biodégradation de la matière organique dissoute de différents types d'eau.





**Figure 8** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (bactéries/ml, comptage microscopique en épifluorescence) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : flore naturelle mixte (eau de Seine).

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (bacteria/ml, epifluorescent counts) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : mixed indigenous bacteria (Seine).*



**Figure 9** Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (bactéries/ml, dénombrement microscopique en épifluorescence) pour différents types d'eau. Inoculum : flore naturelle mixte (eau de Seine).

*Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (bacteria/ml, epifluorescent counts) for different types of water. Inoculum : mixed indigenous bacteria (Seine).*

Cette étude démontre que :

— Le paramètre CODB traduit dans 90 % des cas le potentiel de recroissance bactérienne des eaux d'origines très diverses ( $r = 0,943$ ) lorsque celles-ci sontensemencées par une flore bactérienne mixte, indigène des eaux.

— La relation entre ce paramètre et les maxima de croissance obtenus avec des souches pures de bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* P17 utilisé seul ( $r = 0,716$ ) ou en mélange avec *Spirillum* NOX ( $r = 0,850$ ) est plus faible. La souche de bactéries *Spirillum* NOX a une affinité très variable selon la nature des sous produits d'ozonation. La comparaison des valeurs de CODB et de COA obtenues avec deux souches bactériennes (P17 + NOX) conduit à des résultats concordants dans 60 % des cas ( $r^2 = 0,592$ ).

— pour les échantillons d'eau testés, 1 mg de CODB correspond à 90-140  $\mu\text{g}$  de COA eq. acétate.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COALLIER J., LAFRANCE P., DUCHESNE D., LAVOIE D., 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable : *Sc. Tech. eau* ; 22 : 63-72.
- JAGO P., SHARP D.E., 1988. Proceedings of AOC meeting held at WRC (feb. 15) ; Medmenham, UK. 38 p.
- JORET J.C., LEVI Y., 1986) Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, 39 : 3-9.
- JORET J.C., LEVI Y., DUPIN T., GIBERT M., 1988. Rapid method for estimating bioeliminable organic carbon in water. AWWA, Annual Conf. ; Orlando, Fla.
- JORET J.C., LEVI Y., GIBERT M., 1989. The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC) : a tool in water treatment. *Water Supply* ; 7 : 41-45.
- JORET J.C., LEVI Y., VOLK C., 1990. Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria. IAWPRC, International Symposium on Health Related Water Microbiology (apr. 1-6) ; Tubingen (F.R.G.).
- KAPLAN L.A., BOTT T.L., 1989. Implementation and evaluation of a simplified bioassay for assimilable organic carbon in water distribution systems. Project of Stroud Water Research center of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 22 p.
- KAPLAN L.A., BOTT T.L., 1990. Nutrients for bacterial growth in drinking water : Bioassay evaluation. Project summary, US EPA. 8 p.
- KEMMY F.A., ERY J.C., BREACH R.A., 1989. Development and operational implementation of a modified and simplified method for determination of assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. *Water Sci. Technol.*, 21, 3 : 155-159.
- LECHEVALLIER M.W., CAWTHON C.D., LEE R.G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 10 2492-2499.
- LECHEVALLIER M.W., LEE R.G., MOSER R.M., 1989. Bacterial nutrients in drinking water. American Water Works Service Company, INC. 53 p.
- MOGREN R.M., SCARPINO P., SUMMERS R.S., 1990. Measurement of biodegradable dissolved organic carbon in drinking water. Proc. Annual AWWA Conf. (june 18-24) ; Cincinnati, OH.
- OLSON B.H., 1982. Assessment and implications of bacterial regrowth in water distribution systems. EPA 600/52-82-072. US. Environmental Protection Agency.
- REASONER D.J., RICE E.W., 1989. US EPA experiences with AOC and coliforms

- growth response assays. Workshop on measurement of AOC in the field of drinking water treatment (nov. 89) ; Karlsruhe, RFA.
- RIBAS F., ERIAS J, LUCENA F., 1991. A new dynamic method for the rapid determination of the biodegradable dissolved organic carbon in drinking water, *Jour. Appl. Bact.*, 71. à paraître.
- RIZET M., FIESSINGER F., HOUEL N., 1982. Bacterial regrowth in a distribution system and its relationship with the quality of the feed water : cases studies. Proceeding of the American Water Works Technology Conference, 1982, Miami Beach, pp. 1199-1274.
- SERVAIS P., BILLEN G., HASCOET M.C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res* ; 21 : 445-450.
- STANFIELD G., JAGO P.H., 1987. The development and use of a method for measuring the concentration of assimilable organic carbon in water. WRC Environment. 43 p.
- Supplement Standard Methods for the examination of water and wastewater, (1991). Assimilable Organic Carbon (Proposed standard method). Supplement 18<sup>e</sup> édition. APHA. AWWA WPCF. sous presse.
- VAN DER KOOIJ D., HIJNEN W.A.M., 1981. Utilisation of low concentrations of starch by a flavobacterium species isolated from tap water. *Appl. Envir. Microbiol.* ; 41 : 216-221.
- VAN DER KOOIJ D., WISSER A., HIJNEN W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. AWWA* ; 74 : 540-545.
- VAN DER KOOIJ D., HIJNEN W.A.M., 1984. Substrate utilisation by an oxalate consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 47 : 551-559.
- WERNER P., 1985. Eine Methode zur Bestimmung der Verkeimungsneigung von Trinkwasser. *Vom Wasser* ; 65 : 257-270.
- WERNER P., HAMBSCH B., 1986. Investigations on the growth of bacteria in drinking water. *Water Supply* ; 4 : 227-232.





## **Chapitre II**

# **Effets de l'oxydation sur la production de CODB**

**(Etude de laboratoire)**



## Situation du problème et objectifs de l'étude.

L'élimination de la matière organique et notamment de sa fraction biodégradable est l'un des principaux objectifs du traitement de l'eau. Les étapes de clarification (coagulation-floculation-décantation) et de filtration (filtre à sable ou à charbon actif biologique) y contribuent largement (Janssens *et al.*, 1984; Bower et Crowe, 1988, Bablon *et al.*, 1988; Van der Kooij *et al.*, 1989; Joret *et al.*, 1989a, 1989b; Welte et Montiel, 1992; Bonnet *et al.*, 1992; Van der Kooij et Hijnen, 1992; Bouillot *et al.*, 1992; LeChevallier *et al.*, 1992; Servais *et al.*, 1992). En revanche, les traitements d'oxydation par l'ozone conduisent à la formation de composés biodégradables à partir de molécules appartenant à la fraction réfractaire du COD (Jarret et Ducause, 1985; Van der Kooij et Hijnen, 1985, Werner et Hambsch, 1986; Joret et Levi, 1986; Gilbert, 1988; Joret *et al.*, 1989b; Ventresque et Bablon, 1989; Langlais *et al.*, 1991; Huck *et al.*, 1991; Shukairy *et al.*, 1992; LeChevallier *et al.*, 1992).

Cette conversion exige le passage de l'eau sur des supports biologiques afin que la biodégradation se réalise. La combinaison de l'oxydation par l'ozone et de la filtration sur un filtre à charbon actif biologique nécessite le contrôle et la maîtrise de la quantité de CODB formé afin que le maximum de celui-ci soit éliminé lors de la filtration.

Afin d'apporter des données utiles aux traiteurs d'eau, pour l'optimisation et la modélisation des étapes d'oxydation dans les filières de potabilisation, nous avons étudié plus particulièrement l'augmentation de la biodégradabilité de la matière organique engendrée par différents traitements oxydation (utilisant l'ozone seul et couplé au peroxyde d'hydrogène ou à un catalyseur).

Les objectifs de ce travail étaient:

- de quantifier la production de CODB en fonction du taux et du temps de traitement d'oxydation par l'ozone,

- d'apprécier les modifications éventuelles de cette formation de CODB quand l'ozone est couplé au peroxyde d'hydrogène. Le système ozone - peroxyde d'hydrogène est employé pour l'élimination des pesticides tels que l'atrazine, cependant l'effet de ce couplage sur la production de matière organique biodégradable est encore mal connu. Ceci nous a conduits à étudier l'influence du ratio peroxyde d'hydrogène/ozone ainsi que de la dose et du temps de traitement sur la formation de CODB.

- de tester un nouveau système d'oxydation catalytique hétérogène combinant l'ozone et le dioxyde de titane (procédé Catazone<sup>®</sup>). Nous avons comparé l'efficacité de l'oxydation par l'ozone seul, et couplé au peroxyde d'hydrogène ou au catalyseur sur la minéralisation du carbone organique dissous et l'augmentation de sa fraction biodégradable dans une solution synthétique d'acides fulviques.

A ce titre, des tests d'oxydation ont été réalisés à l'aide d'une technique simple de laboratoire, "l'Ozotest", qui simule les effets de l'ozonation et qui permet d'effectuer un bilan d'oxydation complet (détermination de la quantité d'ozone réellement consommée par la matrice de l'eau). Les changements intervenant au sein de la matière organique de deux types d'eau (eau de rivière et effluent de filtre à sable) ou dans une solution synthétique d'acides fulviques après oxydation ont été évalués par suivi des variations de l'absorbance UV à 254 nm, des concentrations en CODB (mesurées à l'aide d'une flore naturelle fixée) et de la minéralisation du COD.

Ces différents aspects ont été développés dans les trois projets d'articles suivants: "*Effect of ozone on the production of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) during water treatment.*", "*Effect of ozone-hydrogen peroxide combination on the formation of biodegradable dissolved organic carbon.*" et "*Comparison of the effect of ozone, ozone hydrogen peroxide system and catalytic ozone on the biodegradable organic matter of a fulvic acid solution.*".

## Références bibliographiques

- Bablon G.P., Vantresque C. and Ben Aïm R., 1988 Developing a sand GAC filter to achieve high biological filtration. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **80**: 47-53.
- Bonnet M.C., Welte B. and Montiel A., 1992 Removal of biodegradable dissolved organic carbon in water treatment plant. *Wat. Res.*, **26**: 1673-1680.
- Bouillot P., Servais P., Billen G. et Levi Y., 1992. Elimination du carbone organique dissous biodégradable durant la filtration biologique sur charbon actif en grains. *Sci. Eau*, **5**: 33-49.
- Bower E.J. and Crowe B.B., 1988. Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **80**: 82-92.
- Gilbert E., 1988. Biodegradability of ozonation products as a function of COD and DOC elimination by the exemple of humic acids. *Wat. Res.*, **22**: 123-126.
- Huck P.M., Fedorack P.H. and Anderson W.B., 1991. Formation and removal of assimilable organic carbon during biological treatment. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **83**: 69-80.
- Janssens J.G., Mehews J. and Diricks J., 1984. Ozone enhanced biological activated carbon filtration and its effects on organic matter removal and in particular on AOC reduction. *Wat. Sci. Technol.*, **17**: 1055-1068.
- Jarret M. et Ducause C., 1985. Détermination du carbone organique adsorbable et du carbone organique biodégradable dans les eaux au cours d'affinage. *Sci. Eau*, **4**: 163-179.
- Joret J.C. et Levi Y., 1986. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, **39** : 3-9.
- Joret J.C., Levi Y. and Gibert M., 1989a. The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC): a tool in water treatment. *Wat. Supply*, **7** : 41-45.
- Joret J.C., Levi Y., Paillard H. and Ravarini P., 1989b. Comparison of different full scale drinking water treatment plants for removal of biodegradable dissolved organic carbon. *Proc. A W W A, Annual Conf.*, Los Angeles, CA.

Langlais B., Reckhow D.A. and Brink D.R. eds., 1991. Ozone in water treatment, Applications and Engineering. AWWA Res. Found. - Lewis Publisher; 569p.

LeChevallier M.W., Becker W.C., Schorr P. and Lee R.G., 1992. AOC reduction by biologically active filtration. *Sci. Eau*, 5: 113-142.

Servais P., Billen G., Bouillot P., and Benezet M., 1992. A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment. *Aqua*, 3: 163-168.

Shukairy H.M., Miltner R.J. and Summers R.S., 1992. Control of disinfection by-products and biodegradable organic matter through biological treatment. *Sci. Eau*. 5: 1-16.

Van der Kooij. D. and Hijnen W.A.M., 1985. Regrowth of bacteria on assimilable organic carbon in drinking water. *J. Fr. Hydrol.*, 16 : 201-218.

Van der Kooij. D. and Hijnen W.A.M., 1992 AOC removal and accumulation of bacteria in experimental sand filter. *Sci. Eau*. 5: 17-32.

Van der Kooij. D., Hijnen W.A.M. and Kruithof J.C., 1989. The effect of ozonation, biological filtration and distribution on the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC). *Ozone Sci. Engrg.*, 11: 297-311.

Ventresque C. and Bablon G., 1989. Ozone, a mean of stimulating activated carbon reactors. *Proc. 9th. Ozone World Congress*, IOA, New York; USA.

Welte B. et Montiel A., 1992. Elimination du CODB par une combinaison de traitements biologiques dont la filtration lente dans une filière de production d'eau potable. *Sci. Eau*, 5:165-176.

Werner P. and Hambsch B., 1986. Investigations on the growth of bacteria in drinking water. *Wat. Supply*. 4: 227-232.

OZONE SCIENCE & ENGINEERING  
Vol. 15, pp. 389-404  
Printed in the U.S.A.

0191-9512/93 \$3.00 + .00  
International Ozone Association  
Copyright © 1993

## **Effects Of Ozone On The Production Of Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) During Water Treatment**

**C. Volk, C. Renner, P. Roche, H. Paillard and J.C. Joret**

**Anjou Recherche,  
Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux  
Chemin de la digue, BP 76  
78600 Maisons - Laffitte, FRANCE**

**Received for Review : 15 June 1993  
Accepted for Publication : 4 August 1993**



## **Abstract**

This article deals with the oxidation effect of ozone on the increasing fraction of biodegradable organic matter with the "ozotest" method, a laboratory technique which simulates the effect of ozonation and allows a complete oxidation assessment. Ozone treatment was performed on river water samples and sand filter effluent samples. Ozone consumption, reduction of UV absorbance and BDOC formation were monitored with applied ozone doses from 0 to 10 mg/l and with contact times from 0 to 60 min.. The BDOC formation was optimum at an applied ozone dose of 0.25-0.5 mg O<sub>3</sub> per mg DOC (contact time = 5 min.) corresponding to apparition of traces of residual ozone and maximum UV reduction. Maximum ozone consumption, UV reduction and BDOC formation occurred simultaneously during the first 2 minutes of treatment. Concerning BDOC formation, applied ozone dose showed a greater effectiveness than contact time. For the same quantity of consumed ozone, a short contact time associated with a high ozone dose was preferable to a long contact time and a low ozone dose.

## **Key words**

Ozone - "Ozotest" - Organic matter - Oxidation - BDOC formation - Ozone consumption - Reduction of UV absorbance - Contact time.

## **Résumé**

Cet article décrit l'effet de l'oxydation par l'ozone sur l'augmentation de la matière organique biodégradable de l'eau. Les expériences ont été effectuées à l'aide de la méthode "Ozotest", technique de laboratoire qui permet de réaliser un bilan oxydant complet. L'effet de l'ozone a été testé sur des échantillons d'eau de rivière et d'eau après filtration sur sable. La consommation d'ozone, l'abattement de l'absorbance UV à 254 nm et la formation de CODB ont été mesurés

pour des taux d'ozone appliqués de 0 à 10 mg/l et des temps de contact de 0 à 60 min. . La formation de CODB est optimale pour des taux d'ozone de 0.25-0.5 mg O<sub>3</sub> par mg COD (temps de contact de 5 min.). Cet optimum correspond à l'apparition de résiduel d'ozone dans l'eau et au maximum d'abattement de l'absorbance UV (254 nm). La consommation maximale d'ozone, un fort abattement de l'UV et la formation de CODB ont lieu pendant les 2 premières minutes de traitement. Du point de vue de la formation de CODB, le taux de traitement présente un effet plus marqué que le temps de contact. A consommation d'ozone identique, un temps de contact court et un taux d'ozone élevé sont plus efficaces du point de vue de la formation de CODB qu'un temps de contact long associé à un taux d'ozone plus faible.

### **Mots clés**

Ozone - "Ozotest" - Matière organique - Oxydation - Consommation d'ozone - Abattement UV - Temps de contact.

### **Introduction**

To face the increasing demand for drinking water, surface water must be used to produce potable water. Processes applied in a treatment plant have been designed to reduce chronic or accidental pollutants associated with the presence of organic matter. These include tastes, colors, odors, micropollutants and nutrients to support bacterial regrowth.

Chlorine, used for pre-oxidation, reacts with organic matter and creates organochlorinated by-products (trihalomethanes (THM)) (11) that are hazardous to human health. Ozonation is a common process used in water treatment as an alternative to chlorination. The use of ozone in pre- or post-treatment considerably improves the quality of drinking water. Ozone is a powerful disinfectant that effectively oxidizes many chemical pollutants, removes colors, tastes

and odors and enhances decantation-floculation. However, it also increases the biodegradability of naturally occurring organic matter which could encourage bacterial regrowth in distribution systems. Ozonation is often followed by biological treatment (GAC filtration for example) to produce biological stable water, combining chemical oxidation and biological mineralisation to remove naturally occurring organics. This can reduce the need for residual disinfection and control disinfection by-products. The oxidation of organic matter by ozone leads to an increase in molecular polarity, encourages the formation of small molecular weight substances at the expense of larger compounds and reduces aromaticity (reduction of UV absorption) (6)(7). Ozone acts directly to form carbonyls by acting as a dipole agent on C=C double bonds, an electrophilic agent on aromatic compounds by ring hydroxylation, or a nucleophilic agent on C=N double bonds (2). Ozone can also react indirectly as a free radical to form carbonyls.

It is not easy to characterize the organic matter content in water due to the large number of constituents and their low concentration. A distinction is generally made between humic substances (fulvic and humic acids identified by adsorption on XAD-8 resin) which represent about 50 % of dissolved organic carbon (DOC), hydrophilic acids (30 % of DOC) carboxylic acids (5-8 %), amino-acids (2-3 %), carbohydrates (5-10 %) and trace compounds (12)

The biodegradability of the organic matter can be measured by biological tests based on 2 concepts (3):

- the first is an index of the biodegradable organic matter ("easily" Assimilable Organic Carbon (AOC)). It consists of seeding a preheated or filtered water sample with pure strains (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* strain NOX...) or mixed inocula of indigenous bacteria and monitoring the bacterial growth (spread plate counts, ATP measurements). The maximum growth reached after a few days incubation is converted into AOC (by using a

growth yield of bacteria in solutions of known acetate concentration) The results are expressed in Carbon equivalent acetate ( $\mu\text{g C eq. acetate / l}$ ) (3)(4)(13).

The evaluation of bacterial growth by turbidity measurement allows determination of the growth rate ( $\mu$ ) and the yield coefficient giving cell production during the experiment ( $\log Y/Y_0 = \log \text{turbi. end} / \log \text{turbi. start}$ ) (15).

- in the second approach, the BDOC content of water is evaluated by the reduction of the DOC in a water sample incubated with suspended indigenous bacteria or with bacteria fixed on sand particles. The BDOC concentration represents the DOC fraction which is mineralized by the heterotrophic flora and corresponds to the difference between the value of initial and minimum DOC (3)(5).

Several authors have noted the increased biodegradability of dissolved natural organic matter following ozonation (4)(5)(6)(13)(15). In a treatment plant, the easily biodegradable organic fraction (described as the H1 part of the BDOC) increased from 0.35 to 0.6 mg/l during ozonation. The slowly biodegradable organic carbon (named H2) was not modified (0.1 mg/l) (6). Many natural organic compounds show a substantial improvement in biodegradability at doses of 0.5 mg  $\text{O}_3$  /mg C (6). However to date, no systematic and extensive work has been done on the optimization of treatment (ozone dose versus contact time) to maximize BDOC production.

This study included experiments to assess the effect of ozone dose and contact time on the oxidation of organic matter and the subsequent increase in organic matter biodegradability. The ozone consumption, reduction of UV absorbance (254 nm wave-length) and BDOC formation were monitored at applied ozone doses from 0 to 10 mg/l and contact times from 0 to 60 min.

## Materials and methods

Successive experiments were done to evaluate the effect of varying ozone dose at a constant contact time (5 min.), the effect of contact time at a constant ozone dose and the combined effect of these two parameters.

### Origin and characteristics of water samples studied.

To simulate pre- or post- ozonation, the experiments were carried out on river waters (Seine and Oise ) and rapid sand filter effluent samples (Mery/Oise treatment plant, France).

The river water samples (raw water) came from the River Seine (Maisons-Laffitte, France) and the River Oise (Mery/Oise treatment plant, France). Raw water samples were filtered (Durieux No. 28, glass fiber filter) to remove suspended particles. Characteristics of water samples studied are given in Table I.

**Table I:** MAIN CHARACTERISTICS OF WATER SAMPLES STUDIED.  
(DOCi: initial dissolved organic carbon; RDOC: refractory dissolved organic carbon, BDOC: biodegradable dissolved organic carbon)

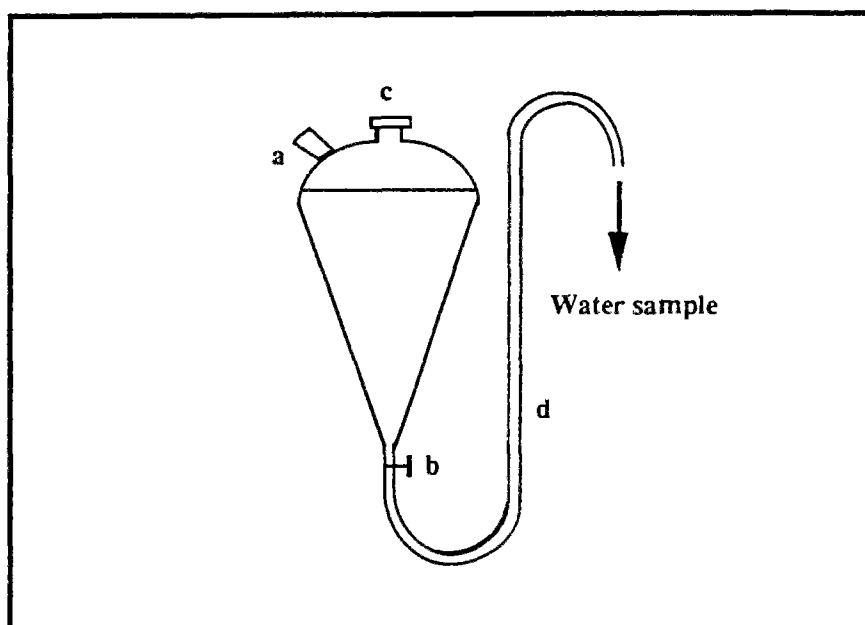
| Experi-<br>ment                  | Water<br>Type      | Sample<br>Number | DOCi<br>(mg/l) | RDOC<br>(mg/l) | BDOC<br>(mg/l) | Alkalinity<br>(°F) | pH  |
|----------------------------------|--------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|-----|
| Effect<br>of ozone<br>dose (C)   | River Oise         | 1                | 3.98           | 2.40           | 1.58           | 22                 | 7.9 |
|                                  | River Seine        | 2                | 3.93           | 1.88           | 2.05           | 14                 | 7.8 |
|                                  | Filter<br>Effluent | 3                | 3.10           | 2.28           | 0.82           | 19                 | 7.6 |
| Effect of<br>contact<br>time (T) | River Oise         | 4                | 3.78           | 2.29           | 1.59           | 22                 | 7.9 |
|                                  | River Seine        | 5                | 3.97           | 1.93           | 2.04           | 21                 | 7.9 |
|                                  | Filter<br>Effluent | 6                | 3.69           | 2.94           | 0.75           | 18                 | 7.6 |
| Combined<br>effect<br>of CT      | River Oise         | 7                | 4.51           | 3.35           | 1.16           | 19                 | 7.7 |
|                                  | Filter<br>Effluent | 8                | 3.69           | 2.94           | 0.75           | 18                 | 7.7 |

### **Ozone production:**

Ozone was produced by a laboratory ozonizer (Trailgaz, Lab 76), supplied with oxygen (Air liquide, N48-Oxygen), producing a maximum of 90 mg O<sub>3</sub>/l. The concentration of ozone during our experiments was 70 mg O<sub>3</sub> per liter of oxygen.

### **Oxidation test with ozone:**

Experiments were performed at 20 °C using the Ozotest method (9), a technique that simulates the effects of ozonation and allows an assessment of oxidation efficiency (Figure 1).



**Figure 1:** Experimental reactor system used for the Ozotest method. The reactor consists of a flask with a septum (a) for the injection of oxidant, nitrogen or potassium iodide, a tap (b), a glass plug (c) and a removable glass tube (d) to evacuate the sample.

Ozone treatment was applied to one liter samples at atmospheric pressure. Since the reactor is sealed, the ozone was injected via the septum using a gas syringe (Hamilton 1002 type of 50-

100 ml). The flask was placed on an automatic shaker (Agitelec apparatus) with adjustable agitation duration and speed (agitation speed was constant in all experiments).

After the ozone contact, the sample was evacuated by nitrogen pressure (inert gas, quality N50). The tap was closed before complete evacuation of the water sample to retain a water interface that trapped the gas phase in the flask.

### **Measurements:**

Dissolved ozone concentrations in water were determined by the indigo method (1). Ozone dose in the gas phase was determined by iodometry (10), using a potassium iodide solution at 2 mg/l (injected with a syringe via the septum) to determine the amount of residual ozone within the gas phase. The ozone consumption (chemical consumption of the organic matter and self-destruction) was defined as the difference between the initial ozone dose applied and the sum of ozone residues in water and gas. UV absorbance was determined at 254 nm with a spectrophotometer (Philips PU8625). BDOC was determined with bacteria fixed on sand as described by JORET and LEVI (5). A water sample (300 ml) was inoculated with 100 g of washed biologically active sand (from a treatment plant without prechlorination) and incubated at  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  under aeration (4 l/h). DOC values were analyzed daily in duplicate by persulfate oxidation (O.I. 700 TOC Analyzer) until minimum values were reached. BDOC values were calculated from the difference between initial DOC and minimum DOC.

## **Results and discussion**

To assess the factors controlling oxidation of organic matter and BDOC formation during ozonation, ozone consumption, reduction of UV absorbance, and BDOC formation in river water

and sand filter effluent samples were studied under three experimental conditions. These included increasing ozone dose at a constant contact time, increasing contact time at a constant ozone dose, and the combination of ozone dose and contact time.

#### *Effect of the applied ozone dose.*

The variation in ozone consumption, reduction of UV absorbance (254 nm) and BDOC formation versus applied ozone dose (0-10 mg/l) at a contact time of 5 min. were measured in river waters (samples 1 and 2, Table I) and rapid sand filter effluent (sample 3, Table I) (Figure 2).

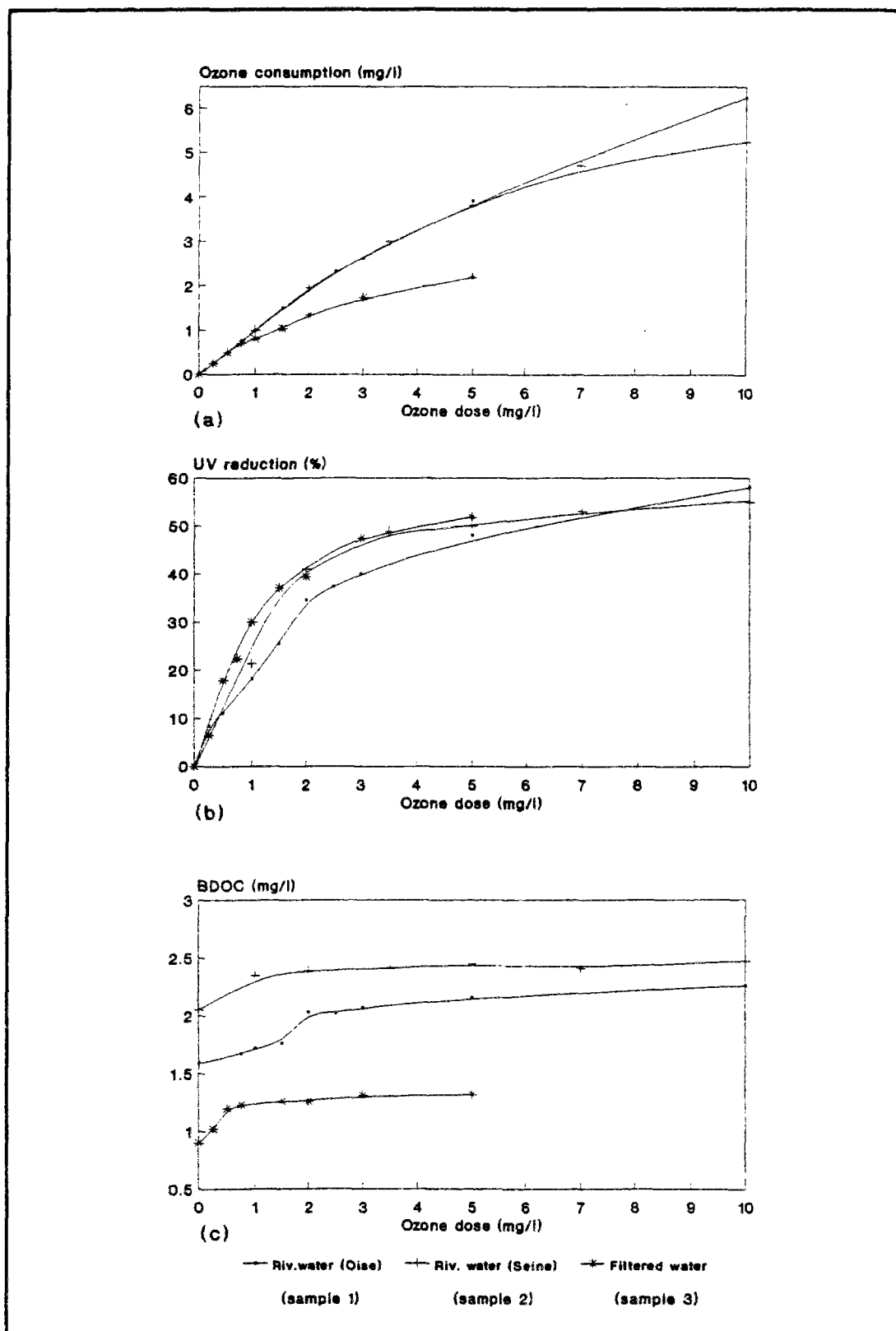
No residual ozone was found in either river water sample subjected to ozonation, with ozone doses up to 2 mg  $O_3$ /l (Figure 2a). Total ozone consumption occurred at an ozonation rate of approximately 0.5 mg  $O_3$  / mg DOC, while at higher applied ozone doses the proportion consumed decreased, resulting in ozone residues. DOC concentrations in the two river waters were very similar, and their ozone consumption patterns also were similar.

For the filter effluent, ozone doses up to 0.75 mg/l resulted in complete ozone consumption and corresponded to 0.25 mg  $O_3$  / mg DOC (Figure 2a). At higher doses, ozone residues appeared. The ozone consumption of the sand filtered water sample was approximately half that of the two river water samples.

Ozone reacts with humic substances, reducing their color and UV absorbance. The aromatic rings in humic substances are responsible for most of the absorbance. After ozonation, reduced UV absorbance (254 nm) reflects the decrease in aromaticity and the organic matter change (6).

For the two river waters, UV absorbance decreased sharply with applied ozone dose up to 2 mg  $O_3$ /l (Figure 2b). Optimum UV reduction was obtained at a relative ozone rate of 0.5 mg  $O_3$  / mg





**Figure 2:** Ozone consumption (a), UV reduction (254 nm) (b) and BDOC formation (c) in river waters (samples 1 and 2, Table I) and sand filtered water (sample 3, Table I) as a function of the ozone dose (contact time: 5 min.).

DOC. However, for the Oise River sample, UV reduction was lower (16% reduction in UV absorbance /mg O<sub>3</sub>) than for the Seine River (21%/ mg O<sub>3</sub>). Thus the organic matter in the Oise sample seems to be more refractory to ozonation than that in the Seine water. This phenomenon can be explained by the difference in organic matter nature and content.

For the filter effluent, UV absorbance decreased rapidly up to 1 mg O<sub>3</sub> /l (UV reduction of 66% / mg O<sub>3</sub>) (Figure 2b). This optimum change in organic matter corresponded approximately to maximum ozone consumption (0.30 mg O<sub>3</sub> / mg DOC). At higher doses, the effect of ozone on UV absorbance was less pronounced.

The curves of BDOC formation versus ozone dose for the different water samples are given in figure 2c. As expected, ozone treatment increased the biodegradability of naturally occurring organic matter. In the case of river water (samples 1 and 2, Table I) the BDOC formed in 2 stages (Figure 2c):

- at low ozone doses (0 - 2 mg O<sub>3</sub>/l), the rate of BDOC formation was high (0.20 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>). The optimum dose for BDOC formation was 1 mg O<sub>3</sub>/l (0.25 mgO<sub>3</sub>/mg DOC) for Seine and 2 mg O<sub>3</sub>/l (0.5 mgO<sub>3</sub>/mg DOC) for the Oise water.
- at higher ozone doses, BDOC production changed little (less than 0.05 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>).

The amount of BDOC produced during ozone treatment was not directly related to the BDOC content of the raw water, as 0.4 mg/l of BDOC was produced for both Seine and Oise River waters. This represents 20 and 30% of their initial BDOC content respectively (2.05 mg/l and 1.58 mg/l respectively).

Applied ozone doses typically used for pre-ozonation of river water in France are approximately 0.2 mg O<sub>3</sub> / mg DOC (for removal of color, oxidation of manganese...). These doses are lower than the optimum conditions for BDOC formation or the maximum rate of ozone consumption by organic matter.

For sand filtered water, at ozone doses up to 0.75 mg/l (0.25 mg O<sub>3</sub> / mg DOC), BDOC formation increased rapidly (0.45 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>) (Figure 2c), while above 0.75 mg O<sub>3</sub>/l, BDOC concentrations increased slowly (less than 0.05 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>). The increase in BDOC concentration represented 45% of the initial BDOC level. In terms of treatment, inter-ozonation leads to immediate BDOC production.

During our experiment, for a five - minute contact, the effect of ozone was optimum for BDOC formation at ozone rates of 0.5 mg O<sub>3</sub>/mg DOC (Oise River water) and 0.25 mg O<sub>3</sub>/ mg DOC (Seine water, filter effluent). At the same time, traces of ozone residues appeared and UV reduction was optimum. At these rates, all the biodegradable organic matter likely to be formed has already been formed. The ozone consumption did not accurately reflect the transformation of the organic matter. For the same quantity of consumed ozone, UV reduction and BDOC production differed for the 2 river samples. The Oise sample gave a slower UV reduction and a greater BDOC formation than the Seine water. Ozone was effective at lower doses for filter effluent (lower ozone consumption, greater BDOC formation and UV reduction). The fraction of organic matter removed in the first stage of coagulation - flocculation seems to consume large quantities of ozone.

Experiments performed with an ozonation pilot on the same water type (sand filter effluent from Mery/Oise treatment plant, DOC<sub>i</sub>=2.6 mg/l; BDOC=0.3 mg/l) gave similar results. For increasing ozone doses (0 - 5 mg O<sub>3</sub>/l, contact time = 7 min.), maximum BDOC production was reached for an applied ozone dose of 2 mg/l (0.75 mg O<sub>3</sub>/mg DOC). At this dose, ozone consumption was 1 mg/l. Increase in BDOC concentration was 60% of initial BDOC content.

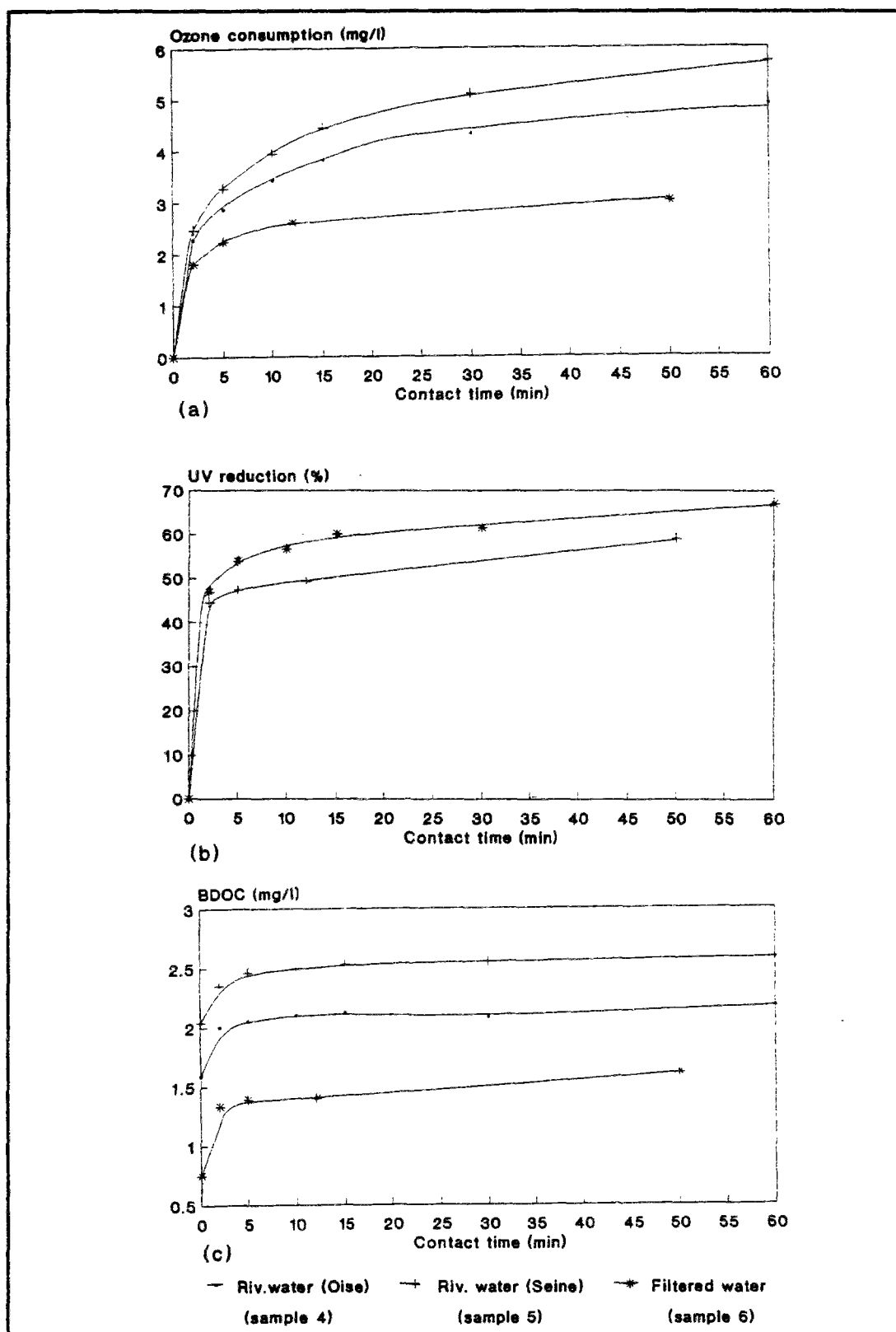
During the ozonation step of the sand filtered water in the Mery/Oise treatment plant, BDOC production represented 100% (filter effluent I: DOC<sub>i</sub>=3.0 mg/l, BDOC=0.5 mg/l), 35% (filter effluent II: DOC<sub>i</sub>=2.5 mg/l, BDOC=0.8 mg/l) and 60% (Filter effluent III: DOC<sub>i</sub>=2.6 mg/l, BDOC=0.5 mg/l) over the initial concentration for ozone doses of 0.5, 1.2, and 1.35 mgO<sub>3</sub>/mg DOC, respectively (unpublished data).

The concentrations of BDOC formed following ozonation recorded during our study agree with the literature (4)(6)(8)(13)(15). In a study on the effect of ozone on river water (Rosssdale water treatment plant, Edmonton, Alberta, Canada), HUCK *et al.* (6) reported that ozone doses of 0.5 mg O<sub>3</sub>/ mg DOC resulted in an increase in AOC concentration (13). In another study (8), increasing ozone rates up to 2 mg O<sub>3</sub>/mg TOC have been shown to increase the AOC measurements by P17 and NOX procedure in a raw water sample (TOC=149 mg/l). AOC productions represented 214% of initial concentration for NOX *Spirillum* bacteria and 115% for P17 *Pseudomonas* bacteria. At this rate, BDOC showed an increase of 0.3 mg/l (8). WERNER (15) showed that the assimilable fraction of humic substances increased sharply at doses up to 1 mg O<sub>3</sub>/mg DOC. Results similar to ours were obtained in a study on the effect of the ozone dose on BDOC production, where in the optimum ozone doses for waters from 3 rivers were 1.5, 2 and 1 mg O<sub>3</sub>/l respectively (6). With ozone doses between 1 and 3.5 mg/l, maximum AOC production occurred in sand filtered water at a dose of 2 mg O<sub>3</sub>/l (4). All these results show an increase in the biodegradable fraction of organic carbon at moderate ozonation levels.

Higher doses have little effect on the biodegradability of the organic matter. It seems that certain molecules are either resistant to the action of ozone or transformed into non biodegradable by-products.

### **Effect of contact time**

Figure 3 shows the variation in ozone consumption, UV absorbance reduction (254 nm) and the BDOC formation with contact time for Oise water (sample 4, Table I), Seine water (sample 5, Table I) treated with 5 and 6 mg O<sub>3</sub>/l respectively (1.5 mg O<sub>3</sub>/mg DOC), and rapid sand filtered water (sample 6, Table I) treated with 3 mg O<sub>3</sub>/l (0.8 mg O<sub>3</sub>/mg DOC). The applied ozone doses were high to insure a residual ozone after a long contact time (50 - 60 min.).



**Figure 3:** Ozone consumption (a), UV reduction (254 nm) (b) and BDOC formation (c) in river waters (samples 4 and 5, Table I) and sand filtered water (sample 6, Table I) as a function of the contact time.

Ozone reacted with the organic matter within the first minutes of treatment. During that time, high ozone consumption, high UV absorbance abatement and an increase in BDOC values were observed. After 2 min. of contact, the ozone consumption was 40-45% of the ozone dose for the river water samples, and 60% for the sand filtered water (Figure 3a). The ozone consumption increased only slowly after longer contact.

UV absorbance reduction was similar for the various samples studied and was 45-48% after 2 min. of contact (UV absorbance reduction was approximately 24% / min. contact time). It increased by an additional 20 % (for river waters) after 60 min. and 15 % (for filter effluent) after 50 min. (reduction of 0.3% / min. contact time) (Figure 3b).

The increase in BDOC concentration was 15-25 % ( Seine water: 0.15 mg BDOC / min. contact time; Oise water: 0.3 mg BDOC / min. contact time), and 80 % (filter effluent: 0.35 mg BDOC / min. contact time) after treatment for 2 min.. For longer contact times, BDOC concentrations increased slowly with an increase of 10 % for the river waters after 60 min.. For the filtered water, an additional increase of 30% was observed after 50 min. (Figure 3c).

Ozone reacted quickly with the organic matter within the first minutes of treatment through direct and selective action. Oxidant disappeared quickly and biodegradable by-products increased after the transformation of aromatic compounds. This first stage corresponds to the initial phase of ozone consumption, during which ozone reacts with aromatic sites and double bonds (13). Ozone consumption is slower at longer contact times (long term ozone consumption phase), corresponding to the oxidation of less reactive sites or ozone by-products (13).

#### **Effect of applied ozone dose - contact time (CT) combination**

Figures 4 and 5 show the variation in ozone consumption, UV reduction and BDOC formation versus applied ozone dose for Oise water (sample 7, Table I) submitted to applied ozone doses

of 0.75, 1.5, 3, 5 and 10 mg/l (contact time = 2, 5, 10, 30 and 60 min.) and rapid sand - filtered water (sample 8, Table I) submitted to applied ozone doses of 0.25, 0.75, 1.5, 3 and 8 mg/l (contact time = 2, 5, 12 and 50 min.).

#### Low ozone doses:

At low ozone doses ( $O_3 < 2$  mg/l for river water;  $O_3 < 1$  mg/l for the filter effluent), ozone was completely consumed in the first 2 minutes of contact (Figures 4a and 5a). The small quantity of ozone reacted rapidly with the organic matter. No residual ozone was found in either gas or aqueous phase after 2 min. of contact. UV absorbance reduction was little affected by contact time. It was 20% in the river water sample with an applied ozone dose of 1.5 mg/l and 25% in filter effluent with an applied ozone dose of 0.75 mg/l. BDOC production was also similar, whatever the contact time. BDOC formation was 45 % (0.50 mg/l) in the river water (applied ozone dose = 1.5 mg/l) and 30 % (0.25 mg/l) in the filter effluent (applied ozone dose = 0.75 mg/l).

At low doses, ozone reacted with the organic matter within a few minutes.

#### Intermediate ozone doses:

A contact time of 2 min. was not enough to have a maximum BDOC production in either sample. Ozone transfer was not optimum at these doses.

With river water, when the applied ozone dose varied from 2 to 5 mg/l, the maximum BDOC formation was reached within 5 min. BDOC values showed no change when the contact time increased from 5 to 10, 30 or 60 min. (Figure 4c). In this case, ozone transfer was not the limiting factor. Most of the ozone reacted with organic compounds within 5 min.

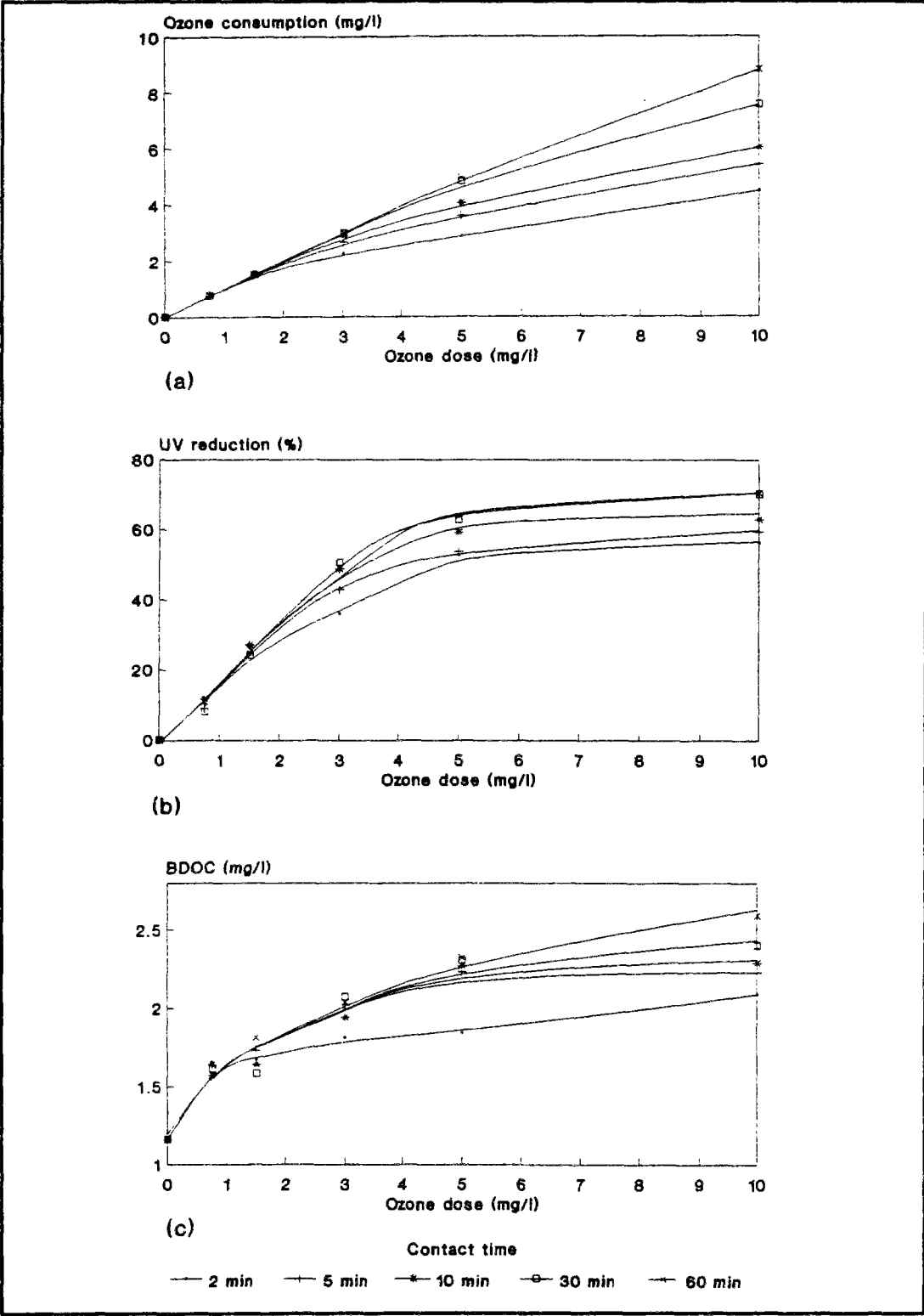


Figure 4: Ozone consumption (a), UV reduction (254 nm) (b) and BDOC formation (c) in river water (sample 7, Table I) as a function of the ozone dose and contact time.



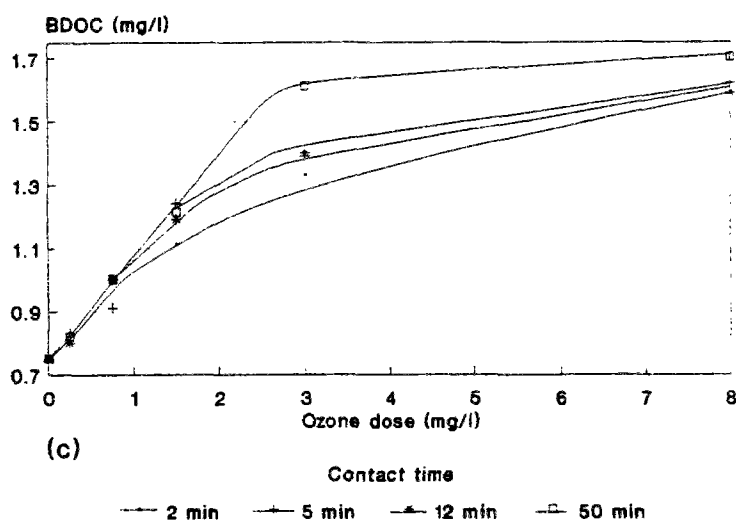
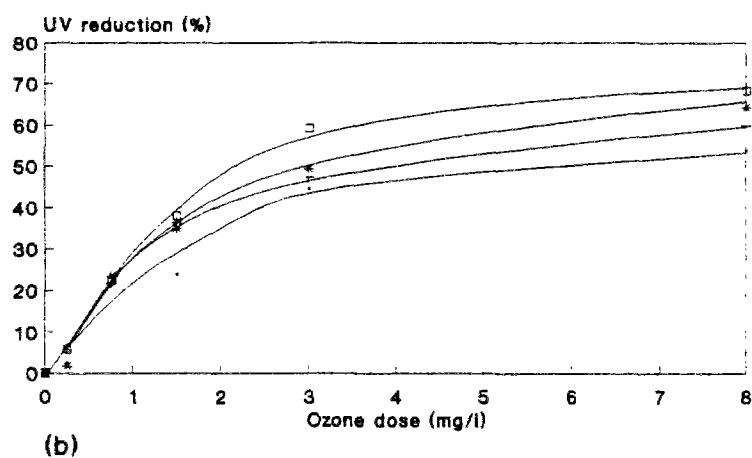
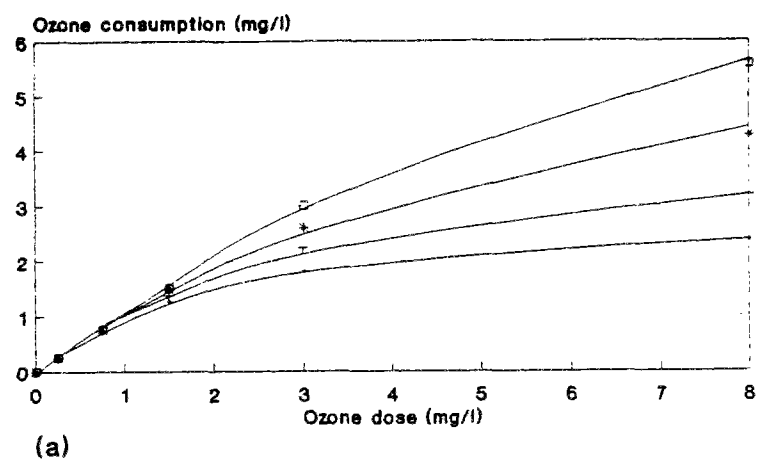


Figure 5: Ozone consumption (a), UV reduction (254 nm) (b) and BDOC formation (c) in sand filtered water (sample 8, Table I) as a function of the ozone dose and contact time.

With sand filtered water, no differences in BDOC values were observed after a treatment of 5 or 12 min. as the ozone doses evolved from 0.75 to 3 mg O<sub>3</sub>/l (increase of BDOC of 65 % at an ozone dose of 1.5 mg/l and a contact time of 5 min.) (Figure 5c). However, a significant increase in BDOC was observed (105% with 3 mg O<sub>3</sub>/l) after a very long contact time (50 min.) . With a longer contact time, residual ozone can react on slightly biodegradable compounds (low reaction kinetics) (2).

For both of studied water samples, representation of BDOC concentrations for different contact times versus ozone consumption (Figure 6) suggested that high ozone dosages for a short contact time appeared to produce more BDOC than low ozone doses for a longer contact time. Indeed, for a similar ozone consumption, produced BDOC concentrations were higher for a 5 min. contact time (corresponding to higher applied ozone doses) than for a period of 10 or 12 min. (corresponding to lower applied doses).

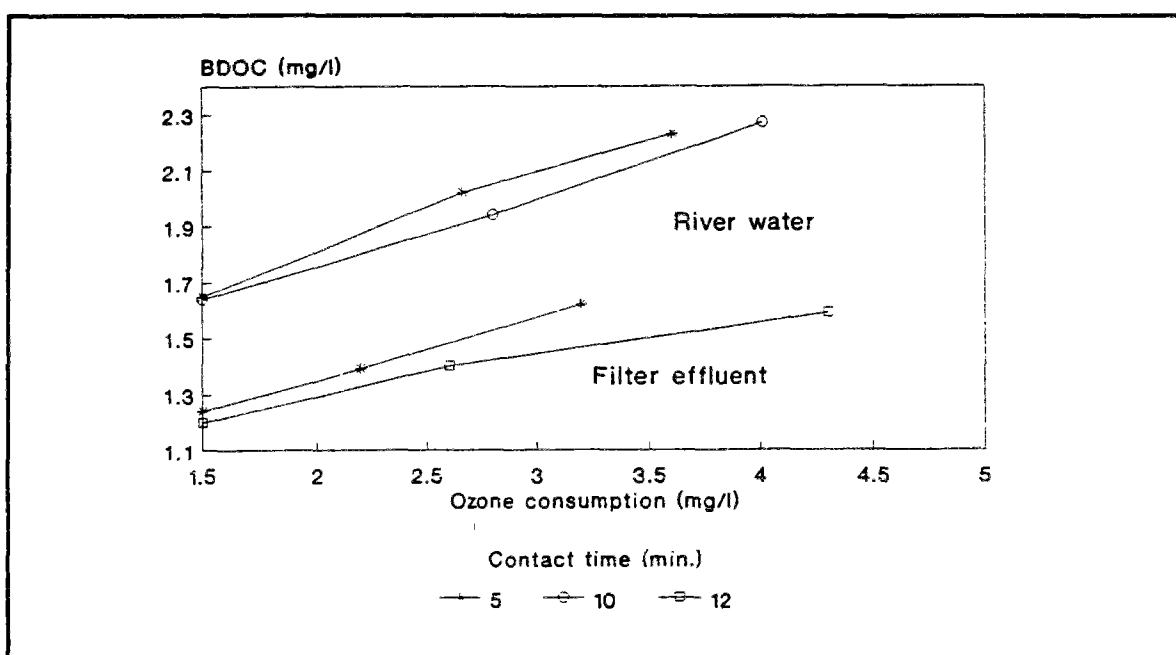
#### High ozone doses:

With river water, a high ozone dose (10 mg/l) and a long contact time (60 min.) seemed to improve the oxidation process with BDOC formation reaching 123% ( $\Delta$  BDOC = 1.43 mg/l) (Figure 4c). With filter effluent, BDOC concentrations continued to increase as contact time and ozone dose increased (Figure 5c). The maximum BDOC increase amounted 115 % of the original concentration, or 0.86 mg/l. These results show that a long contact with ozone present allows for the oxidation of compounds that have low reaction kinetics.

In conclusion, at low ozone doses ( $O_3 < 0.4$  mg/ mg DOC), all the effects of ozone occurred quickly. At intermediate applied ozone doses (0,5 - 1,5 mg O<sub>3</sub>/mg DOC) the ozone dose seems to have more effect than the contact time. For the same quantity of consumed ozone, a short contact time associated with a high ozone dose is preferable to a long contact time and a low

ozone dose High ozone doses (more than 2 mg O<sub>3</sub>/mg DOC) and long contact times (50-60 min.) lead to a clear increase of BDOC values. This phenomenon may be related to an oxidation of some ozone by-products or a wider spectrum of molecules which are not affected at intermediate doses.

For either type of water, the optimum oxidation yield was reached within 5 min. at an ozone rate of 0.5 mg O<sub>3</sub>/mg DOC. Such conditions are generally applied in full scale water treatment plants.



**Figure 6:** BDOC formation in river water (sample 7, Table I) and filter effluent (sample 8, Table I) as a function of the ozone consumption and for different contact times.

## Conclusion

This study on the effects of ozone used a simple, rapid and efficient laboratory method to simulate ozonation and obtain a complete assessment of oxidation. Applied to two types of water (river and sand filtered water), this study showed that:

- with 5 min. contact, the optimum BDOC formation (corresponding to the optimum UV absorbance reduction) was obtained with an ozone dose of 0.25 - 0.50 mg O<sub>3</sub> / mg DOC. Traces of residual ozone appeared at these doses. The BDOC formation was 20 - 30% of the original concentration in the river waters (0.25 - 0.35 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>) and 45% in the sand filtered water (0.45 mg BDOC / mg O<sub>3</sub>). Ozone had more effect on BDOC production in filter effluent than river water.

- BDOC was formed within the first minutes of treatment. It was accompanied by fast ozone consumption, (40 - 60% of ozone consumed within 2 min.), and high UV absorbance reduction (45 - 48% within 2 min.). After 2 min. in contact, BDOC production reached 0.15 - 0.30 mg / mg O<sub>3</sub> for river waters and 0.35 mg BDOC / mg O<sub>3</sub> for the filtered water.

- Concerning the influence of the two parameters, ozone dose and contact time, on BDOC production, for the same quantity of consumed ozone, a short contact time and a high ozone dose were preferable to a long contact time and a lower ozone dose. For river and a filtered water, the optimum of BDOC formation was obtained with an ozone dose of 0.5 mg O<sub>3</sub> / mg DOC and 5 min. of contact.

### **Acknowledgments**

This manuscript was greatly improved by the comments of L. A. Kaplan (Stroud Water Research Center, Philadelphia).

## References

- 1 - BADER H. and HOIGNE J. Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Res.* **15** : 449-456 (1981).
- 2 - DORE M. Chimie des oxydants et traitement des eaux. Technique et documentation, Lavoisier ed. Paris (1989).
- 3 - HUCK P. Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth potential in drinking water. *Jour. AWWA*, **86**, 6 : 78-86 (1990).
- 4 - JAGO P.H. and STANFIELD G. Application of ATP determination to measurement of growth potential in water. *Res. Report, Water Res. Center, Medmenham, UK* (1984).
- 5 - JORET J.C. and LEVI Y. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, **510**, 39 3-9 (1986).
- 6 - LANGLAIS B., RECKHOW D.A. and BRINK D.R. eds.. Ozone in water treatment, Applications and Engineering. AWWA Res. Found. - Lewis Publisher, 569p (1991).
- 7 - MEIJERS A.P. Quality aspects of ozonisation. *Water Res.*, **11**: 647-652 (1977).
- 8 - MILTNER R.J., RICE E.W. and SMITH B.L. Ozone's effect on assimilable organic carbon, disinfection byproducts, and disinfection byproducts precursors. *Proceedings, AWWA, WQTC conference, Orlando FL*. :409-420 (Nov. 10-14, 1991).
- 9 - ROCHE P., VOLK C., CARBONNIER F. and PAILLARD H.. Water oxidation by ozone or ozone hydrogen peroxide using the "Ozotest" or "Peroxotest" methods. Submitted to *Ozone Sci. Engrg.*, (1992).
- 10 - RODIER J.. L'analyse de l'eau (eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer). 7th ed.; DUNOS ed. (1984).
- 11 - ROOK J.J. Formation of haloforms during chlorinations of natural water. *Wtr Trmt. Exam.*, **23** : 234-242 (1974).
- 12 - THURMAN E.M. Development in biochemistry organic geochemistry of natural water. NIJHAFF M., Dr JUNK W. Publishers, DORDRECHT (1985).
- 13 - VAN DER KOOIJ D. and HIJNEN W. A. M.. Substrate utilisation by an oxalate-consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 551-559 (1984).
- 14 - XIONG F. contribution à l'étude de l'ozonation des acides fulviques aquatiques. These chimie et microbiologie de l'eau. Univ. Poitiers - no 383 (1990).

15 - WERNER P. and HAMBSCH B. Investigations of the growth of bacteria in drinking water. Wat. Supply, 4, 3 : 227-231 (1986).



OZONE SCIENCE & ENGINEERING  
Vol. 15, pp. 405-418  
Printed in the U.S.A.

0191-9512/93 \$3.00 + .00  
International Ozone Association  
Copyright © 1993

## **Effects Of Ozone-Hydrogen Peroxide Combination On The Formation Of Biodegradable Dissolved Organic Carbon**

**C. Volk, P. Roche, C. Renner, H. Paillard, and J. C. Joret**

**Anjou Recherche  
Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux  
Chemin de la Digue, BP 76  
78600 Maisons - Laffitte, FRANCE**

**Received for Review : 15 June 1993  
Accepted for Publication : 4 August 1993**



### **Abstract**

The effects of ozone and ozone/ hydrogen peroxide on BDOC formation were studied with the "Ozotest" method, a laboratory technique that permits the assessment of oxidation efficiency. Oxidation treatments were performed on river water and sand filter effluent samples. Ozone consumption, reduction of UV absorbance, and BDOC formation were monitored during the experiments. The ratio of 0.35 - 0.45 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mg O<sub>3</sub> used to degrade pesticides was also optimal for the oxidation of organic matter. BDOC formation versus ozone dose curves with ozone alone or ozone / peroxide system were similar. BDOC formation was optimum at an applied ozone dose of 0.5 -1 mg O<sub>3</sub>/ mg C (contact time = 10 min.). The ozone / peroxide system yielded lower BDOC values than ozone alone, a phenomenon related to differences in by-products generated by the two oxidative systems. Moreover, reduction of the concentration of DOC was higher with ozone / hydrogen peroxide than with ozone alone. For both oxidant systems, BDOC formation occurred during the first minute of treatment.

### **Key words**

Ozone - Hydrogen peroxide - Organic matter - Oxidation - BDOC formation.

### **Resumé**

Les effets de l'ozone et du système ozone/ peroxyde d'hydrogène sur la formation de carbone organique dissous biodégradable ont été étudiés à l'aide de la méthode de laboratoire "Ozotest", qui permet l'établissement d'un bilan oxydant complet. Les traitements d'oxydation ont été réalisés sur des échantillons d'eau de rivière ou d'eau filtrée sur sable. Les paramètres suivis ont

été la consommation d'ozone, l'abattement de l'absorbance UV (254 nm) et la formation de CODB. Le ratio de 0.35 - 0.45 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par mg O<sub>3</sub> utilisé pour la dégradation maximale des pesticides correspond aussi à l'optimum de production de matière organique biodégradable. Les courbes de formation de CODB en fonction de la dose d'ozone après traitement par l'ozone ou par l'ozone/ peroxyde d'hydrogène suivent une évolution identique. La formation de CODB est optimale pour un taux d'ozone de 0.5 -1 mg O<sub>3</sub>/ mg C (temps de contact de 10 min.). Le système ozone / peroxyde conduit à des valeurs de CODB sensiblement plus basses que celles obtenues avec l'ozone seul, ce phénomène semble être dû à une différence des sous produits engendrés par les deux systèmes oxydatifs. De plus, la minéralisation du COD est plus importante en présence de peroxyde d'hydrogène. Pour les 2 systèmes d'oxydants, la production de CODB apparaît très rapidement pendant la première minute de traitement.

### **Mots clés**

Ozone - Peroxyde d'hydrogène - Matière organique - Oxydation - Formation de CODB.

### **Introduction**

Ozone is used in water treatment as a disinfectant, and to remove color, taste, and odor. Ozone acts directly on organic matter to form carbonyls by acting as a dipole agent on C=C double bonds, an electrophilic agent on aromatic compounds by ring hydroxylation, and a nucleophilic agent on C=N double bonds (4). Ozone can also react indirectly as a free radical to form carbonyls. Under the ozonation conditions normally used for water treatment (5 mg O<sub>3</sub>/l and contact time of less than 20 minutes) many molecules are only partially oxidized or are non-

reactive. Ozone/hydrogen peroxide or ozone/UV combinations were developed to oxidize a larger spectrum of organic compounds by increasing the free radical reactivity (6). The ozone/hydrogen peroxide combination can degrade alcohols and aliphatic acids (8), aldehydes, saturated organic acids, and chlorinated solvents (2,3).

The ozone /hydrogen peroxide system has been proposed as a mean to reduce the pesticide content in water (10,12) and thus comply with the European Economic Community (EEC) guidelines for pesticides. Atrazine is more completely eliminated by the  $O_3/H_2O_2$  system than ozone alone. The optimum ratio is 0.35-0.45 mg  $H_2O_2$  per mg  $O_3$  (12), but chlorinated aliphatic compounds which are completely saturated with chlorine (such as carbon tetrachloride), can not be oxidized by the  $O_3/H_2O_2$  system (10).

Ozone enhances the biodegradability of organic matter, increasing molecule polarity, forming small molecular weight substances at the expense of higher molecular weight compounds, and reducing aromaticity (9). The best conditions of ozonation for producing Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) are those which simultaneously provide maximum UV reduction, measured as a change in absorbance at 254 nm (maximum change in aromaticity) and leave traces of ozone residues (15). For a contact time of 5 min., BDOC formation has been found to be highest at an applied ozone dose of 0.25-0.5 mg  $O_3$ /mg C (15).

At present, the effect of the ozone/hydrogen peroxide system on BDOC production is unknown. We therefore studied the effect of ozone/hydrogen peroxide on BDOC formation and compared ozone alone versus ozone/hydrogen peroxide. BDOC production was tested at the  $O_3/H_2O_2$  levels used in pesticide degradation, at constant  $H_2O_2/O_3$  ratios but different  $O_3$  doses, and at differing contact times.

## Materials And Methods

### CHARACTERISTICS OF WATER SAMPLES STUDIED.

To simulate pre or post ozonation, the experiments were carried out on river and sand filtered water samples. Samples of untreated (raw) water were taken from the Oise River (Mery/Oise treatment plant, France). River water samples were prefiltered (glass fiber prefilter, Durieux No. 28) to remove suspended particles prior to experimental treatments. Samples of a rapid sand filter effluent (Mery/Oise treatment plant) were also studied. Characteristics of water samples studied are given in Table I.

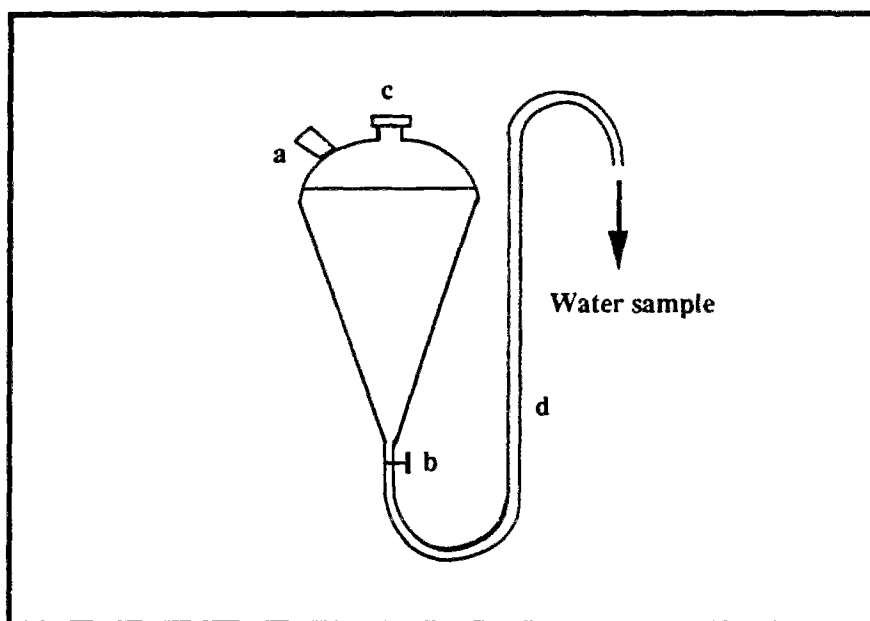
**TABLE I: CHARACTERISTICS OF RIVER OISE WATER USED IN EXPERIMENTAL TREATMENTS** (DOCi= initial dissolved organic carbon; RDOC= refractory dissolved organic carbon; BDOC= biodegradable dissolved organic carbon).

| Experiment  | Water Type | Sample Number | DOCi (mg/l) | RDOC (mg/l) | BDOC (mg/l) | Alkalinity (°F) | pH  |
|---|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-----|
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> Ratio</b> | Raw        | 1             | 4.23        | 2.47        | 1.76        | 23              | 7.9 |
|   | Filter     | 2             | 3.05        | 2.24        | 0.81        | 20              | 7.6 |
|   | Effluent   |               |             |             |             |                 |     |
| <b>Ozone Dose</b>                                       | Raw        | 3             | 3.97        | 2.44        | 1.53        | 22              | 7.8 |
|   | Filter     | 4             | 3.01        | 1.98        | 1.03        | 19              | 7.8 |
|   | Effluent   |               |             |             |             |                 |     |
| <b>Contact Time</b>                                     | Filter     | 5             | 3.33        | 2.43        | 0.90        | 18              | 7.7 |
|   | Effluent   |               |             |             |             |                 |     |

### OZONE PRODUCTION.

Ozone was produced by a laboratory ozonizer (Trailgaz, labo 76), supplied with oxygen (Air liquide, N48 oxygen), producing a maximum of 90 mg O<sub>3</sub>/l. The concentration of ozone during experiments was 70 mg O<sub>3</sub>/l oxygen.

**OXIDATION TESTS WITH OZONE AND OZONE/HYDROGEN PEROXIDE.** Experiments were performed at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  using the Ozotest method (13), a technique that simulates the effects of ozonation and allows complete oxidation assessment (Figure 1). Ozone was applied to a one liter sample at atmospheric pressure, injected via the septum using a glass syringe (Hamilton 1002). When ozone plus hydrogen peroxide was tested, the hydrogen peroxide was added to the water sample before ozone injection. The flask was placed on an automatic shaker (Agitelec) with adjustable agitation duration and speed. Agitation speed was constant in all experiments. After the reaction, the sample was evacuated by nitrogen pressure (inert gas, quality N50). The tap was closed before complete evacuation of the water sample to retain a water interface that trapped the gas in the flask.



**Figure 1:** Experimental reactor system used for the Ozotest method. The reactor consists of a flask with a septum (a) for the injection of oxidant, nitrogen or potassium iodide, a tap (b), a glass plug (c) and a removable glass tube (d) to evacuate the sample.

## MEASUREMENTS

Dissolved ozone concentrations in water were determined by the indigo method (1). Ozone dose in the gas phase was determined by iodometry (14) using 2 mg/l potassium iodide solution

(injected in the flask via the septum) to determine the amount of residual ozone in the gas phase. Hydrogen peroxide residuals were measured by the titanium tetrachloride colorimetric method (5). Ozone consumption (chemical consumption by the organic matter and self-destruction) was defined as the difference between the initial ozone dose applied and the sum of ozone residues in water and gas. UV absorbance was determined at 254 nm with a spectrophotometer (Philips PU8625).

BDOC was determined with bacteria fixed on sand as described by Joret and Levi (7). DOC concentrations were measured daily in duplicate by persulfate oxidation (O.I. 700 TOC analyzer).

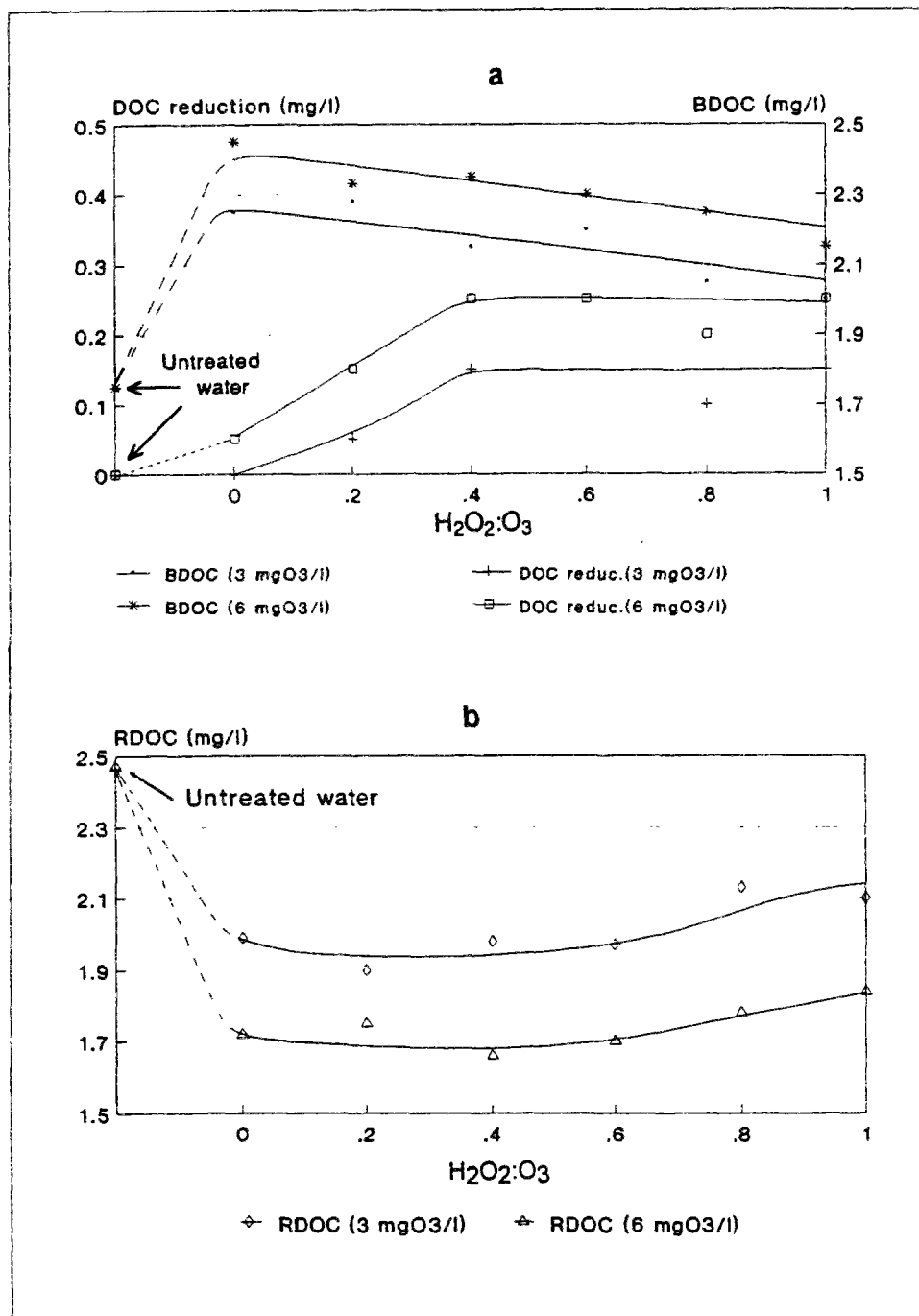
### **Results And Discussion**

The effects of ozone and ozone plus hydrogen peroxide treatments were assessed from changes in organic constituents in the test waters. All treatments reduced DOC concentrations, increased BDOC concentrations, and reduced absorbance at 254 nm. These phenomena varied with ozone dose, the ozone to hydrogen peroxide ratio, and the contact time. In addition to the above parameters, ozone consumption was assessed following treatments.

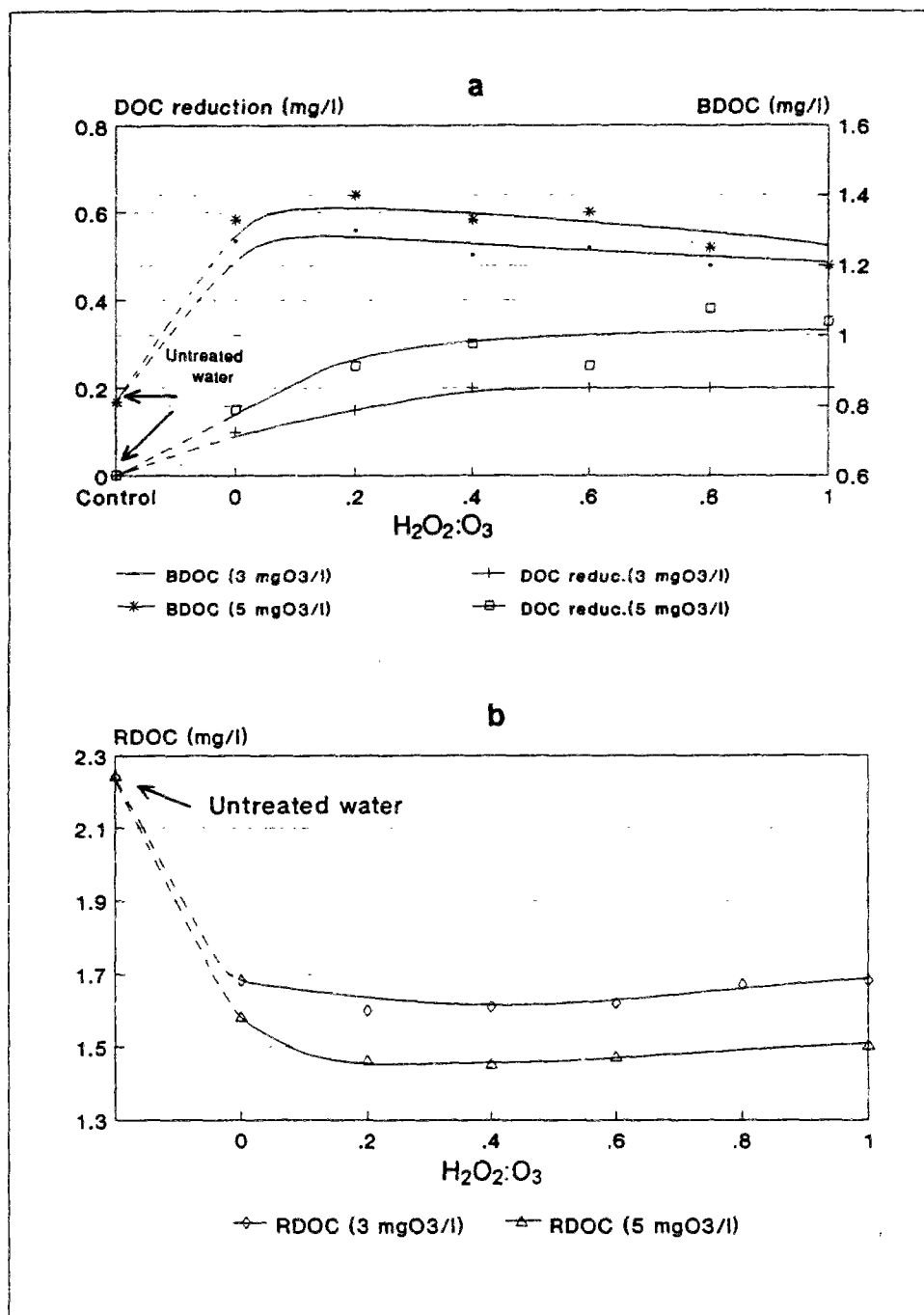
#### **EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE/ OZONE RATIO**

Ozonation alone was less effective in reducing DOC concentrations in raw river water and filter effluent (samples 1 and 2, Table I) than when ozone was combined with hydrogen peroxide (Figures 2a and 3a). The decrease in DOC concentration was greater as more hydrogen peroxide was added, up to a ratio of 0.4, and then it remained constant. A maximum of 10% of initial

DOC was oxidized to carbon dioxide, with higher level of DOC oxidation at any given ratio corresponding to higher ozone doses in the presence of hydrogen peroxide.



**Figure 2:** Reduction of DOC concentrations, BDOC formation (a) and RDOC (b) in raw water (sample 1, Table I) as a function of the hydrogen peroxide/ozone ratio (ozone doses : 3 and 6 mg/l; contact time: 10 min.).



**Figure 3:** Reduction of DOC concentrations, BDOC formation (a) and RDOC (b) in filter effluent (sample 2, Table I) as a function of the hydrogen peroxide/ozone ratio (ozone doses : 3 and 5 mg/l; contact time: 10 min.).

A maximum BDOC concentration was reached for river water and filter effluent (samples 1 and 2, Table 1) when treated with ozone alone, or with low additions of hydrogen peroxide to the ozone (Figures 2a and 3a). BDOC increases were always greater at higher ozone doses, and as



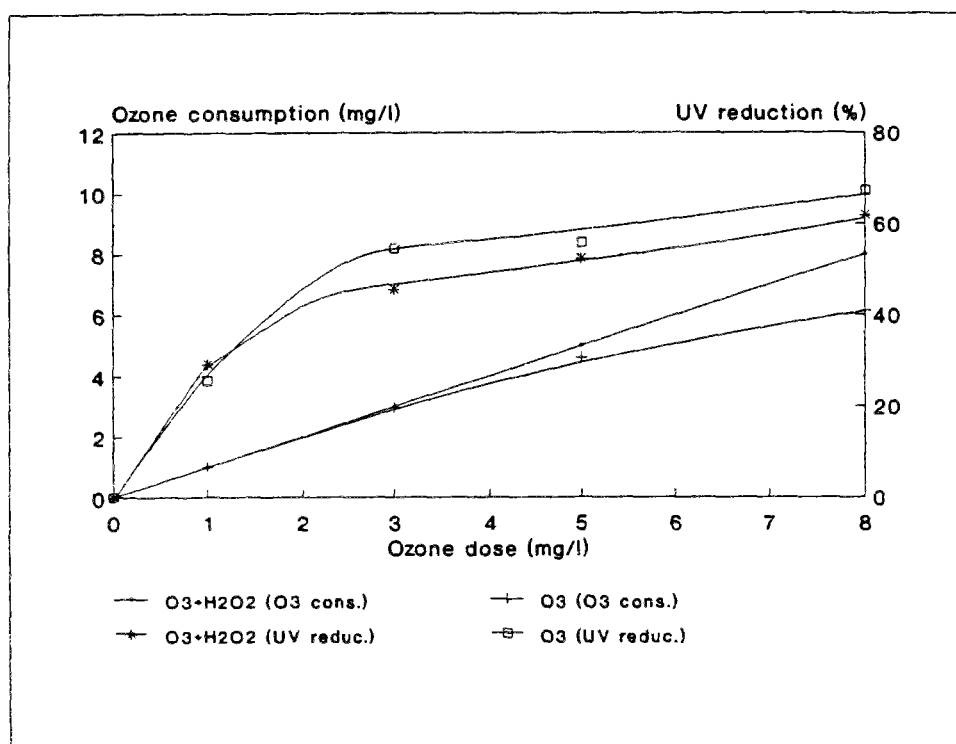
the amount of peroxide increased the amount of BDOC increase diminished. BDOC increased as much as 70% over initial concentrations and the reduction due to hydrogen peroxide was as great as 15%. When the  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$  ratio increased up to 0.4, reduction of DOC concentrations was mainly explained by mineralization of a fraction of the produced BDOC into carbon dioxide; because RDOC remained approximately constant. For a high  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$  ratio, lower BDOC values were explained by a reduced RDOC oxidation (higher RDOC values) (Figures 2b and 3b).

It has been shown that ozone alone has little effect on DOC mineralization (4), acting on aromatic compounds to form carbon dioxide in small quantities. However, the combination of ozone and hydrogen peroxide allows for the transformation of humic and fulvic acid substances. Additionally, ozone plus hydrogen peroxide act on aliphatic compounds due to the high reactivity of  $\text{OH}^\bullet$  free radicals. Paillard *et al.* (10) reported an optimum hydrogen peroxide/ ozone ratio of 0.35 - 0.45 for pesticide degradation. Our findings that a ratio of 0.4 gave optimum organic matter oxidation are consistent with these results. Additional experiments on the effects of ozone dose and contact time, discussed below, were performed with a ratio of 0.35 mg  $\text{H}_2\text{O}_2$ / mg  $\text{O}_3$  (to avoid hydrogen peroxide residues in water) .

With river water (sample 1, Table I), ozone consumption reached 90% at an ozone dose of 3 mg/l and 80% at a dose of 6 mg/l, both in the absence of hydrogen peroxide. When the peroxide was present, ozone was completely consumed. With the filter effluent (sample 2, Table I), ozone consumption was 80% and 60%, for doses of 3 and 5 mg/l, respectively, and no hydrogen peroxide. As with the raw river water, the presence of hydrogen peroxide at low concentrations consumed the ozone. The consumption of ozone by the hydrogen peroxide led to a decline in the oxidation effectiveness of the hydrogen peroxide/ozone system at higher ratios, as demonstrated by the DOC, BDOC and RDOC data (figures 2 and 3).

# EFFECTS OF OZONE DOSE AT A CONSTANT HYDROGEN PEROXIDE/OZONE RATIO (contact time = 10 min).

When ozone alone was used, it was completely consumed at doses up to 3 mg O<sub>3</sub>/l for the raw water (0.75 mg O<sub>3</sub>/mg C) (figure 4) and 1,5 mg O<sub>3</sub>/l for the filter effluent ( 0.5 mg O<sub>3</sub>/mg C) (Figure 6). At higher ozone doses, consumption was lower than the applied dose and the residual ozone increased with the dose. Similar values of ozone consumption were found in a previous study on these types of water (15), demonstrating the constancy of the water matrix.

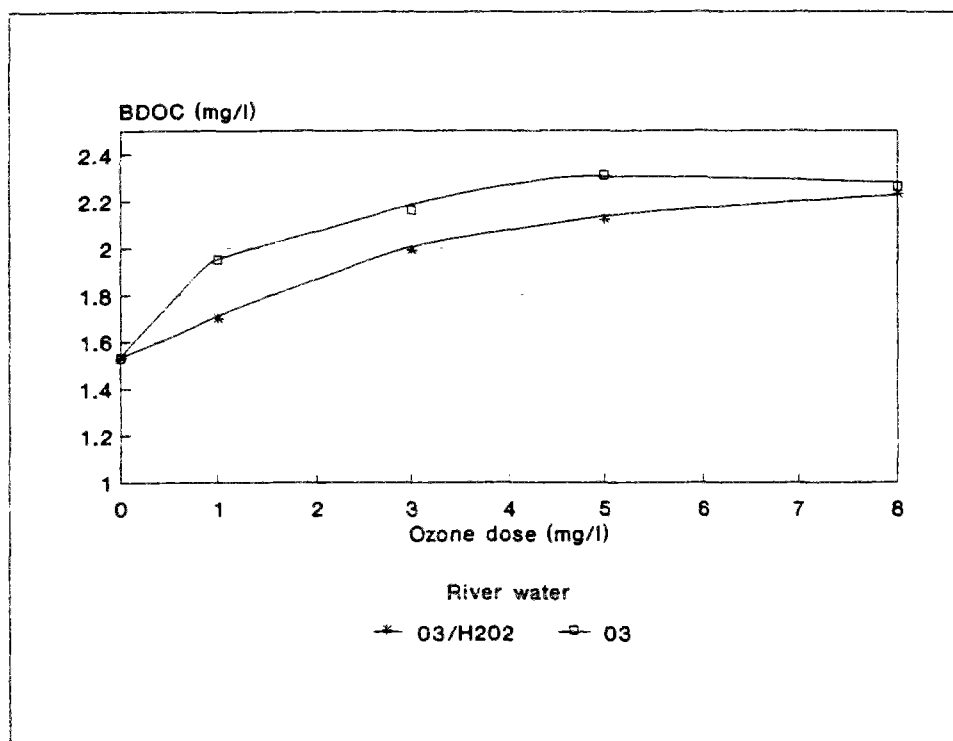


**Figure 4:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:O<sub>3</sub>=0.35) of a raw water (sample 3, Table I) and effect of ozone dose on ozone consumption plus UV reduction (254 nm) (contact time = 10 min.).

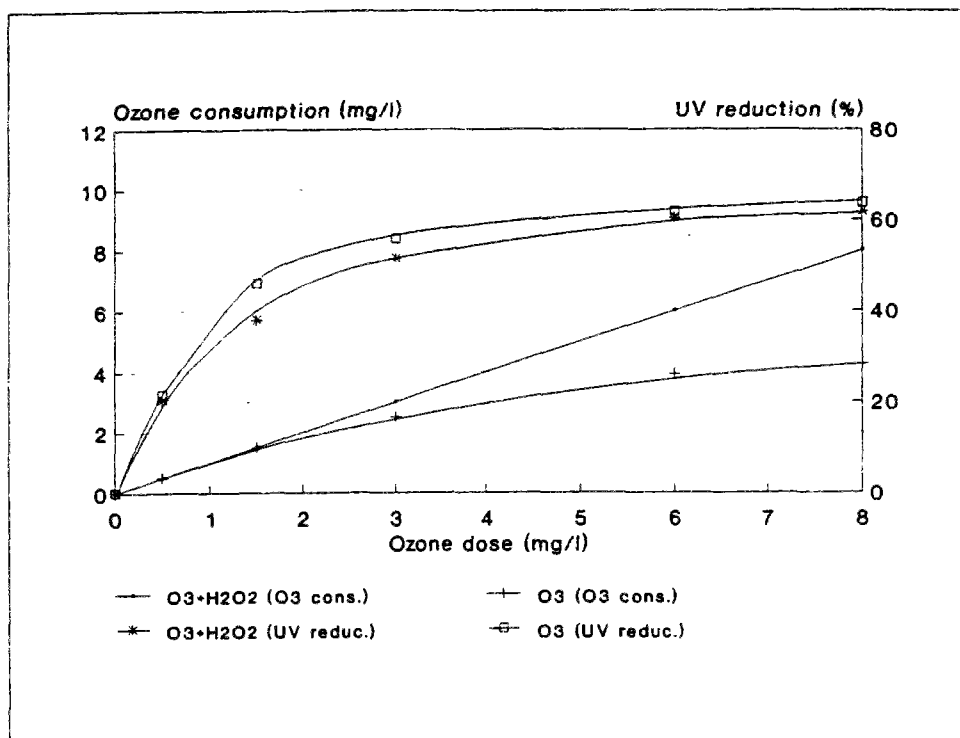
When ozone was used in conjunction with the ozone/hydrogen peroxide, ozone was always completely consumed. This result has been previously reported (10,11), and we suggest that the hydrogen peroxide leads to the decomposition of ozone into hydroxyl radicals.

The reduction in UV absorbance is used as an indicator of loss of aromaticity. With ozone alone, UV absorbance was reduced with increases in the ozone dose up to 3 mg O<sub>3</sub>/l for river water (Figure 4) and 1.5 mg O<sub>3</sub>/l for filter effluent (Figure 6). For both raw water and filter effluent, the maximum reduction in UV 254 absorbance was 60 - 70% . Ozone thus seems to be more effective than the ozone / peroxide system for the loss of aromaticity.

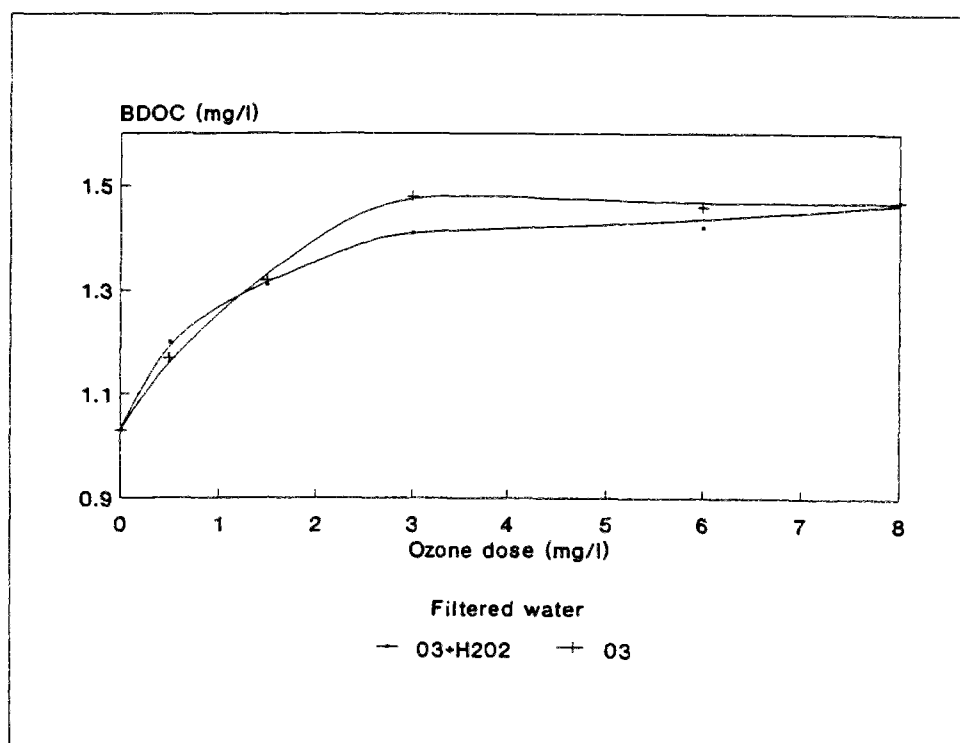
UV absorbance (254 nm) gives partial informations on the organic matter. This suggests a difference in the structure of the by-products generated by the two oxidative systems.



**Figure 5:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:O<sub>3</sub>=0.35) of a raw water (sample 3, Table I) and effect of ozone dose on BDOC formation (contact time = 10 min.).



**Figure 6:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_3=0.35$ ) of a filter effluent (sample 4, Table I) and effect of ozone dose on ozone consumption plus UV reduction (254 nm) (contact time = 10 min.).



**Figure 7:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_3=0.35$ ) of a filter effluent (sample 4, Table I) and effect of ozone dose on BDOC formation (contact time = 10 min.).

BDOC concentrations varied directly as a function of ozone and ozone / peroxide doses (Figures 5 and 7) and the curves describing this relationship were similar.

The greatest increases occurred at an ozone dose of 3 mg/l, or an ozone rate of 0.5 - 1.0 mg  $O_3$ /mg C, at a contact time of 10 min.. These results agree with previously reported data (15, 9). Maximum BDOC concentrations represented an increase of 40 and 45% (ozone alone) or 30 and 35% (ozone/peroxide) over the initial concentrations for river water and filter effluent respectively.

BDOC values changed little between water treated with ozone alone and with the ozone / peroxide system. However, for these water samples, ozone alone seems to give higher BDOC values than ozone/ peroxide.

At a constant hydrogen peroxide/ozone ratio of 0.35 and contact time of 10 minutes, increasing doses of ozone resulted in an increased reduction of DOC concentrations (Table II). Reduction of DOC concentrations was greater with the ozone / peroxide system. With an ozone dose of 8 mg/l, DOC removal was 6 % (raw water) and 12 % (filter effluent) with the ozone/ peroxide combination. With ozone alone, the reduction was 3 % (raw water) and 5 % (filter effluent). In river water, DOC concentration is only reduced at high ozone doses (8 mg  $O_3$  /l with ozone alone; 5 - 8 mg  $O_3$  /l with  $O_3 + H_2O_2$ ). In filter effluent, the reduction of DOC concentrations occurs at lower ozone doses (3 mg  $O_3$ /l). Ozone leads to mineralization of a very small fraction of DOC by a direct and selective action (4). Greater mineralization of DOC is observed with the  $O_3/H_2O_2$  system due to non selective action of radicals.

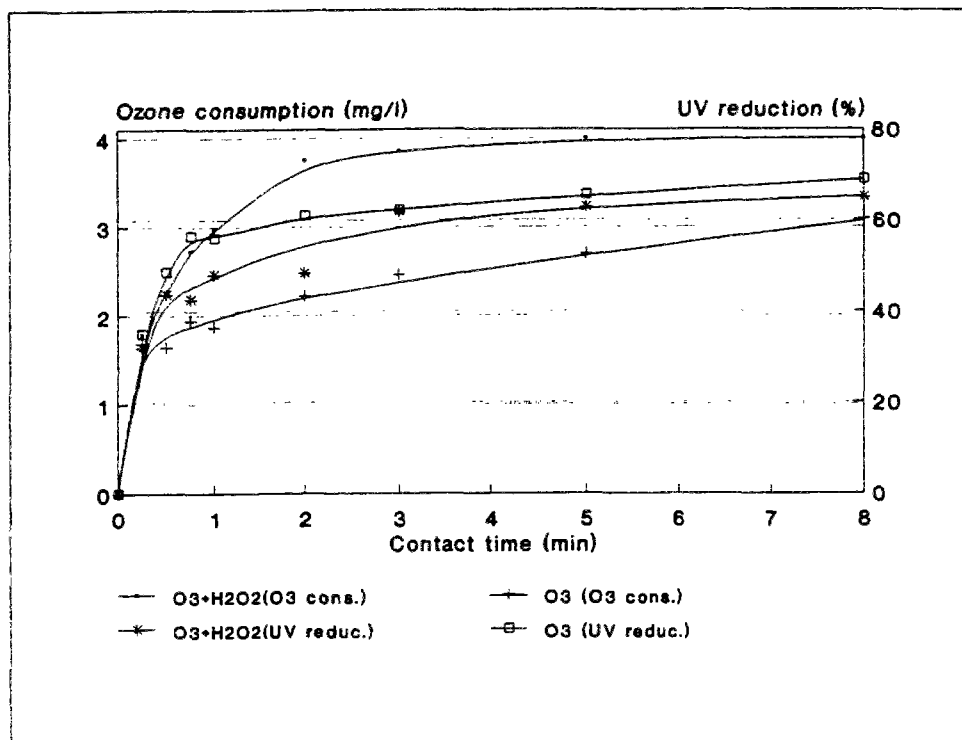
**TABLE II: REDUCTION OF DOC CONCENTRATIONS IN RIVER WATER AND FILTER EFFLUENT WATER TREATED WITH OZONE AND OZONE / HYDROGEN PEROXIDE.** The dashes (-) indicate no experimental data at the corresponding ozone dose.

| Ozone dose<br>(mg/l) | <i>Reduction of DOC concentrations (mg/l)</i> |  |                            |  |
|----------------------|---|--|----------------------------|--|
|                      | River water (sample 3)                        |  | Filter effluent (sample 4) |  |
|                      | O <sub>3</sub>                                | O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | O <sub>3</sub>             | O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 1                    | 0   | 0  | -                          | -  |
| 3                    | 0   | 0  | 0.10                       | 0.11   |
| 5                    | 0   | 0.05   | -                          | -  |
| 6                    | -   | -  | 0.15                       | 0.29   |
| 8                    | 0.10  | 0.25   | 0.10                       | 0.35   |

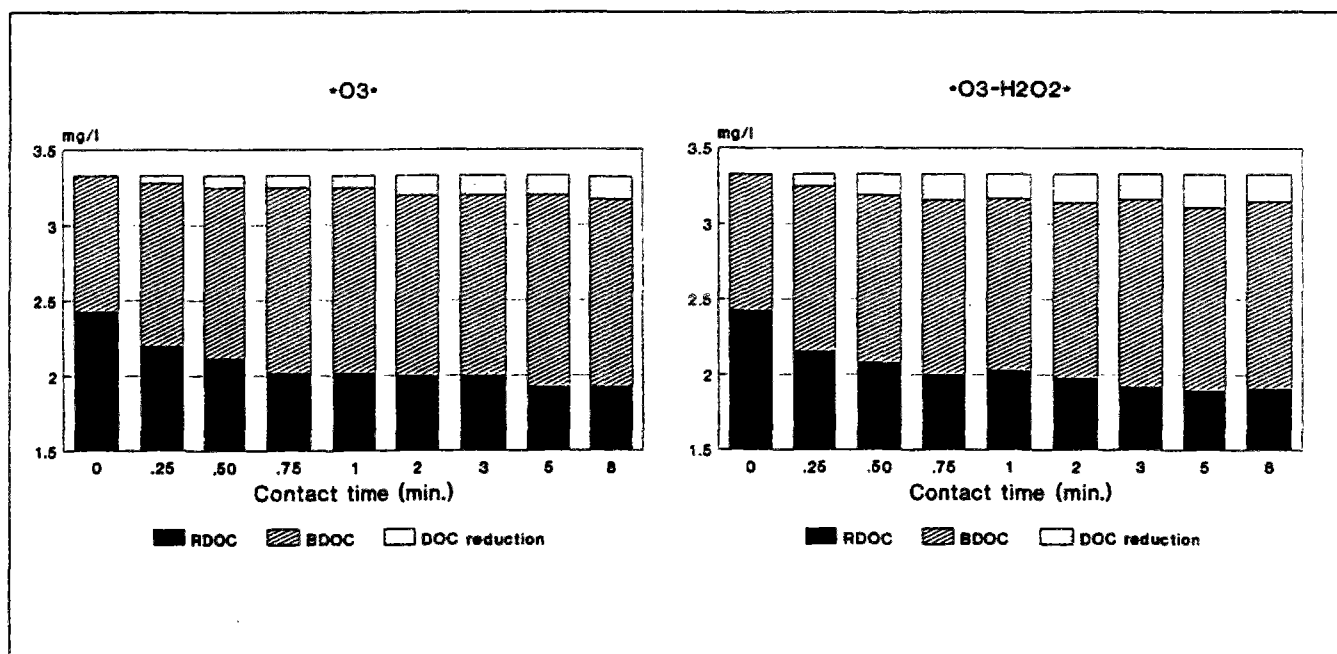
## EFFECT OF CONTACT TIME

When ozone alone at a dose of 4 mg O<sub>3</sub>/l or ozone/hydrogen peroxide at the same ozone dose and a ratio of 0.35 were used on a filter effluent (sample 5, Table I), a rapid ozone consumption, a significant decline in UV absorption (Figure 8) and an increase in BDOC (Figure 9) occurred within the first minute in contact.

After one min., 50% of the ozone dose was consumed in the ozone alone exposure while 75% was consumed in the ozone/hydrogen peroxide system (Figure 8). After 2 min., ozone consumption was nearly complete in the ozone/hydrogen peroxide system.



**Figure 8:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_3=0.35$ ) of a filter effluent (sample 5, Table I) and effect of contact time on ozone consumption plus UV reduction (254 nm) (ozone dose = 4 mg/l).



**Figure 9:** Comparison of ozone and ozone - hydrogen peroxide treatment ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_3=0.35$ ) of a filter effluent (sample 5, Table I) and effect of contact time on BDOC formation and DOC reduction (ozone dose = 4 mg/l).

UV adsorption at 254 nm was reduced sharply after only 15 to 30 sec. of contact and similar values are observed with ozone alone and the ozone / peroxide system (Figure 8). For both oxidant systems, it reflects the oxidation effect on aromatic compounds.

The reduction was maximal after 30 to 45 sec. with both oxidation systems. Ozone alone gave higher levels of reduction than ozone/hydrogen peroxide.

DOC and BDOC changes occurred as a function of contact time (Figure 9). Most of the changes occurred within the first minute of contact, as BDOC increased by 35% with ozone alone and 25% with ozone/hydrogen peroxide. Only minor changes occurred beyond one minute of contact.

### **Conclusions**

This study on the effects of ozone/hydrogen peroxide on BDOC formation, performed with a laboratory method, showed that the  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$  ratio of 0.35 - 0.45 which is typically used to degrade pesticides is also optimal for the oxidation of organic matter as measured by DOC. The decrease in DOC concentration is higher in the  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$  system, while the production of BDOC is higher in the  $\text{O}_3$  system. As the amount of peroxide increased up a ratio of 0.4, the amount of BDOC formed diminished while RDOC remained constant, showing that mineralization of some BDOC occurred. These differences suggest qualitative differences in the oxidation products of the two systems. For both oxidant systems, BDOC formation occurred within the first minute of treatment.



### **Acknowledgments.**

This manuscript was greatly improved by the comments of L. A. Kaplan (Stroud Water Research Center, Philadelphia).

### **Bibliography**

- 1 - BADER H. and HOIGNE J.. Determination of ozone in water by the indigo method. Water Res. 15 : 449-456 (1981).
- 2 - BOURBIGOT M.M., BRUNET R., ZEANA A. and DORE M.. Utilisation simultanée de l'ozone et des rayons UV en traitement d'eau. IOA Berlin, avril 23-24 (1985).
- 3 - BRUNET R., BOURBIGOT M.M. and DORE M.. Oxidation of organic compounds through the combination ozone hydrogen peroxide. Ozone Sci. Engrg., 6 : 163-183 (1984).
- 4 - DORE M.. Chimie des oxydants et traitement des eaux. Technique et Documentation, Lavoisier ed., Paris (1989).
- 5 - EISENBERG G.. Colorimetric determination of hydrogen peroxide Ind. Engng Chem., 15 : 327-328 (1943).
- 6 - HOIGNE J. and BADER H.. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. Water Res., 10 : 377-386 (1976).
- 7 - JORET J.C. and LEVI Y.. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. Trib. Cebedeau, 510, 39 3-9 (1986).
- 8 - NAMBA K. and NAKAYAMA S.. Hydrogen peroxide catalyzed ozonation of refractory organics. I. Hydroxyl radical formation. Bull. Chem. Soc., 55: 3339-3340 (1982).
- 9 - LANGLAIS B., RECKHOW D.A. and BRINK D.R. eds. Ozone in water treatment. Application and Engineering - Lewis Publishers (1990).

- 10 - PAILLARD H., BRUNET R. and DORE M.. Conditions optimales d'application du système oxydant ozone-peroxyde d'hydrogène. Water Res. 22 : 91-103 (1988).
- 11 - PAILLARD H., LEGUBE B. and DORE M.. Effect of alkalinity on the reactivity of ozone toward humic substances and manganese. Aqua, 38 : 32-42 (1989).
- 12 - PAILLARD H.. Elimination of atrazine by a combined  $O_3-H_2O_2$  treatment on the Seine river. Proc 6th European System on organic micropollutants in the aquatic environment. Lisbonne. May 22-24 (1990).
- 13- ROCHE P., VOLK C., CARBONNIER F. and PAILLARD H.. Water oxidation by ozone or ozone - hydrogen peroxide using the "Ozotest" or "Peroxotest" methods. Submitted to Ozone Sci. Engrg., (1992).
- 14 - RODIER J.. L'analyse de l'eau. (Eaux naturelles - Eaux résiduelles - Eaux de mer). 7 th ed.; DUNOS ed. (1984).
- 15 - VOLK C., RENNER C., ROCHE P., PAILLARD H. and JORET J.C.. Effect of ozone on the production of Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) during water treatment. Submitted to Ozone Sci. Engrg., (1992).



***RAPID COMMUNICATION***

**COMPARISON OF THE EFFECT OF OZONE, OZONE HYDROGEN PEROXIDE  
SYSTEM AND CATALYTIC OZONE ON THE BIODEGRADABLE ORGANIC  
MATTER OF A FULVIC ACID SOLUTION.**

**Christian VOLK, Pascal ROCHE, Frédéric CARBONNIER and Hervé PAILLARD.**

ANJOU RECHERCHE, Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux. Chemin  
de la digue, BP 76. 78600 Maisons - Laffitte (France).

**Short title: EFFECT OF 3 OXIDANT SYSTEMS ON THE ORGANIC MATTER.**

**Soumis à *Water Research* (Septembre 1993)**

### **Abstract**

In this study, the effects of ozone, ozone hydrogen-peroxide or catalytic ozone were assessed from changes in the organic constituents of a fulvic acid solution. Oxidation tests were performed with the ozotest method, which allows an assessment of the extent of oxidation. Ozone, ozone hydrogen-peroxide and catalytic ozone mineralized 15%, 18% and 25% of the initial DOC, respectively. The oxidation system that generated the highest BDOC concentrations was ozone hydrogen-peroxide, while catalytic ozone produced the lowest concentrations, ozone alone was intermediate (BDOC of 0.90 mg/l with ozone hydrogen-peroxide, 0.80 mg/l with ozone alone and 0.60 mg/l with catalytic ozone; ozone dose higher than 3.5 mg/l). Catalytic ozone induced oxidation of ozone by-products into CO<sub>2</sub>. Moreover, catalytic ozone led to the highest decrease in chlorine demand.

### **Key words**

Ozone, Ozone hydrogen-peroxide, Catalytic ozone, Dissolved Organic Carbon (DOC), Mineralization, Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC).

### **INTRODUCTION**

Ozone oxidation is a common process in water treatment used to remove water pollutants, odors, color, and tastes. It improves the flocculation stage and the biodegradability of the organic matter, and it is also a good disinfectant. Ozone is often applied prior to a granular activated carbon filter to improve the removal of organic materials and chemical pollutants (Langlais *et al.*, 1991).

However, many compounds are only partially oxidized by ozone or are refractory. Several processes have been performed in conjunction with ozone to increase the oxidation level of molecules and to oxidize a larger spectrum of organic compounds. Ozone hydrogen-peroxide and ozone-UV systems allow a non-selective degradation by free radical oxidation (Hoigne and Bader, 1976). The ozone peroxide combination leads to the degradation of alcohols, aliphatic acids, aldehydes, micro pollutants such as atrazine, and chlorinated solvents that are refractory to the direct action of ozone alone (Bourbigot *et al.*, 1985; Brunet *et al.*, 1984; Paillard, 1990). We observed a disparition of reagent; a TOC reduction and an optimal pH situated at the neutrality.

In an attempt to mineralize a greater fraction of the organic matter to  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  studies have been performed on catalytic oxidation (Al Hayek and Doré, 1985; Al Hayek and Doré, 1990; Paillard *et al.*, 1991a; Paillard *et al.*, 1991b). Catazone is an heterogeneous catalytic ozonation process in which a water sample is ozonated in the presence of a solid catalyst composed of titanium oxide. The catalytic oxidation leads to a high oxidation level of the organic matter without a dissolution of titanium in the water after the ozone oxidation (Paillard *et al.*, 1991a; Paillard *et al.*, 1991b).

The efficiency of catalytic ozone on TOC reduction of oxalic acid solution (refractory to ozone alone) rose 95 %. Catalytic ozone is more effective at higher pH levels (pH ranging from 5 to 9). In contrast to the ozone - peroxide which is affected by the presence of bicarbonates (scavengers), catalytic ozonation does not seem to be affected by increased alkalinity (Sodium-bicarbonate, 0-200 mg/l) (Paillard *et al.*, 1991a). The increase of the oxidant power of catalytic ozone results in low chlorine demands (40% less than ozone and ozone peroxide) and a reduction of THM formation potential (Paillard *et al.*, 1991a).

Our study compares the oxidation of a fulvic acid solution and subsequent generation of biodegradable organic matter by ozone alone, ozone hydrogen-peroxide and catalytic ozone.

## **MATERIALS AND METHODS.**

Fulvic acids were extracted (from CEBRON water) as describe by Thurman and Malcolm (1981). CEBRON water is a surface water used for drinking water production. Its high DOC content (DOC = 15 mg/l) is mainly due to humic substances. The elemental composition is 50.8% of carbon; 5.0% of hydrogen; 1.8% of nitrogen; 38.9% of oxygen and 1.4% of sulfur (Xiong, 1988). The fulvic acids were diluted with a mineral water (VOLVIC water: pH=7 - hardness: 5°2 French or 3°6 English - bicarbonates : 65.3 mg/l - total mineralization at 180°C : 109 mg/l) to conduct the BDOC assay.

Experiments were performed on one liter water samples at atmospheric pressure using the ozotest method, previously described by Roche *et al.* (1993). This allows an assessment of oxidation efficiency. Ozone consumption (chemical consumption and self destruction of ozone in water) is defined as the difference between the initial applied ozone dose and the sum of ozone residues in water and gas.

Hydrogen peroxide was used at a ratio of 0.35 mg of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mg of ozone (Paillard, 1990). The solid catalyst composed of titanium oxide fixed on alumina billet (BST) was preserved in distilled water. The amount of catalyst was 10 g per liter of water sample. Hydrogen peroxide or catalyst were added to the water sample before ozone injection.

Dissolved ozone concentrations in water were determined by the indigo method (Bader and hoigne, 1981) . The residual ozone in gas was analyzed by iodometry (Rodier, 1984) and

hydrogen peroxide residues were measured by the colorimetric titanium tetrachloride method ( $\text{TiCl}_4$ ) (Eisenberg, 1943). UV absorption measurements were performed at 254 nm (spectrophotometer Philips, PU 8025). BDOC was determined by incubating water samples with bacteria fixed on sand as described by Joret and Levi (1986). Chlorine demand determination was based on the measurement of the free chlorine residue concentration after a 1 hour contact time. The water samples were chlorinated at 2 mg/l. Free chlorine residues were measured by the N,N-diethylphenylene -1,4 diamine (DPD) method (Rodier, 1984).

## RESULTS AND DISCUSSION

The aim of these experiments was to compare the effects of three oxidation techniques, ozone, ozone hydrogen-peroxide (ratio: 0.35 mg  $\text{H}_2\text{O}_2$ / mg  $\text{O}_3$ ), and catalytic ozone (10 g catalyst / l of water sample) on the changes in organic matter of a fulvic acid solution ( $\text{DOC}_i = 2.84$  mg/l;  $\text{RDOC} = 2.61$  mg/l;  $\text{BDOC} = 0.23$  mg/l). The effects of the applied ozone dose on the ozone consumption, reduction in UV absorbance and DOC concentration, and changes in RDOC and BDOC concentrations were studied following 10 min. of contact time. Moreover, the effects of these three oxidative systems on the chlorine demand were compared.

Ozone was always completely consumed with ozone / peroxide (Fig. 1). Hydrogen peroxide leads to the decomposition of ozone into hydroxyl radicals (Doré, 1989).

With ozone alone and catalytic ozone, at doses up to 3.5 mg  $\text{O}_3$ /l the ozone was completely consumed (Fig. 1). At higher ozone doses, ozone consumption was not complete, especially for ozone alone. Catalyst increased the ozone consumption at high doses compared to ozone alone. For example, at an applied ozone dose of 6.5 mg/l, ozone consumption reached 70% and 90% respectively, with ozone and catalytic ozone.



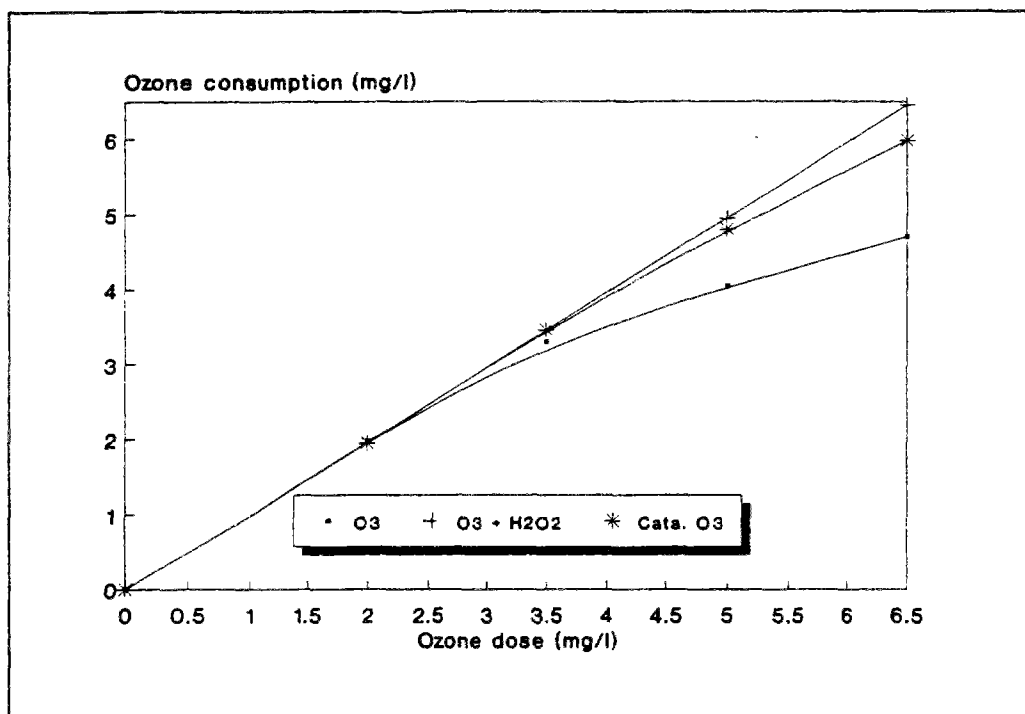


Fig. 1. Ozone consumption versus applied ozone dose for a fulvic acid solution treated with ozone (O<sub>3</sub>), ozone hydrogen-peroxide (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), or catalytic ozone (Cata. O<sub>3</sub>).

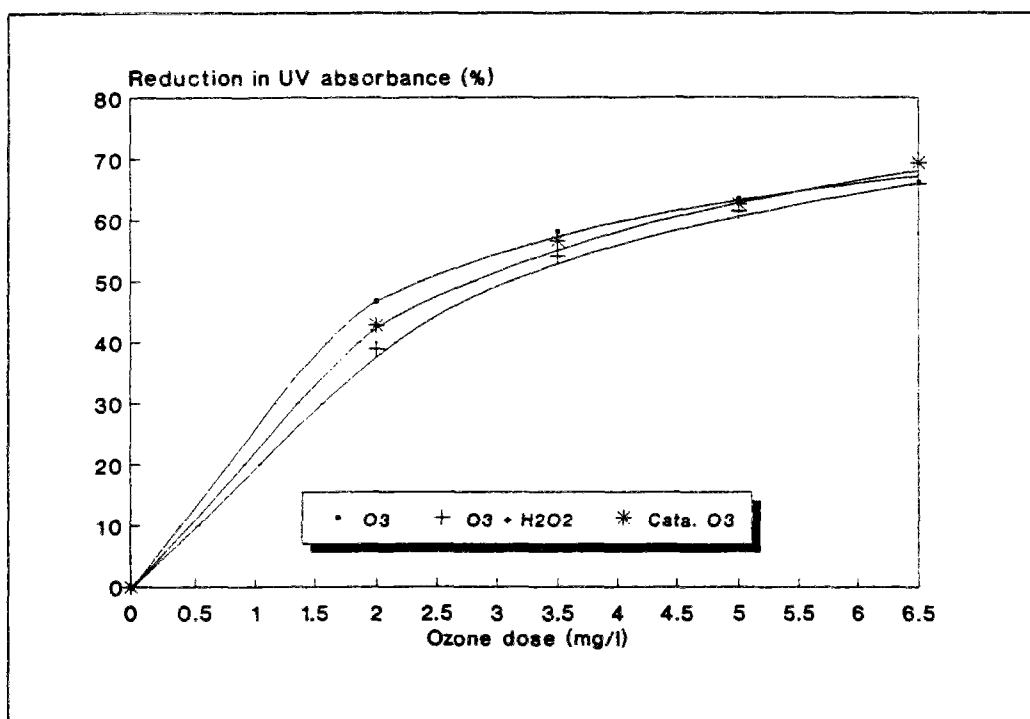


Fig. 2. Reduction in UV absorbance at 254 nm (%) versus applied ozone dose for a fulvic acid solution treated with ozone (O<sub>3</sub>), ozone hydrogen-peroxide (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), or catalytic ozone (Cata. O<sub>3</sub>).

For the 3 oxidant systems, the reduction in UV absorbance was greatest at ozone doses up to 2 mg O<sub>3</sub>/l, ranging from 19 - 23%/mg O<sub>3</sub>, and changed little at higher doses (Fig. 2). Results obtained with the 3 oxidant system are very similar, but ozone and catalytic ozone seem to be more effective in reducing UV absorbance. UV absorbance at 254 nm provides some molecular information about the structure of the organic matter, and these results suggest differences in the structure of the by-products generated by the three oxidative systems.

DOC reduction as a function of ozone dose showed that catalytic ozone was the most effective oxidant at ozone doses above 2 mg/l (Fig. 3). For an applied ozone dose of 6.5 mg/l, DOC reduction reached 0.69 mg/l (25% of initial DOC) with catalytic ozone, 0.52 mg/l (18 %) with ozone peroxide, and 0.44 mg/l (15%) with ozone alone. DOC reduction increased with the ozone dose. With catalytic ozone, no DOC adsorption on the catalyst was observed. Paillard *et al.* (1991b) reported that the adsorption phenomenon on the catalyst was very weak (lower than 3-5% of initial DOC).

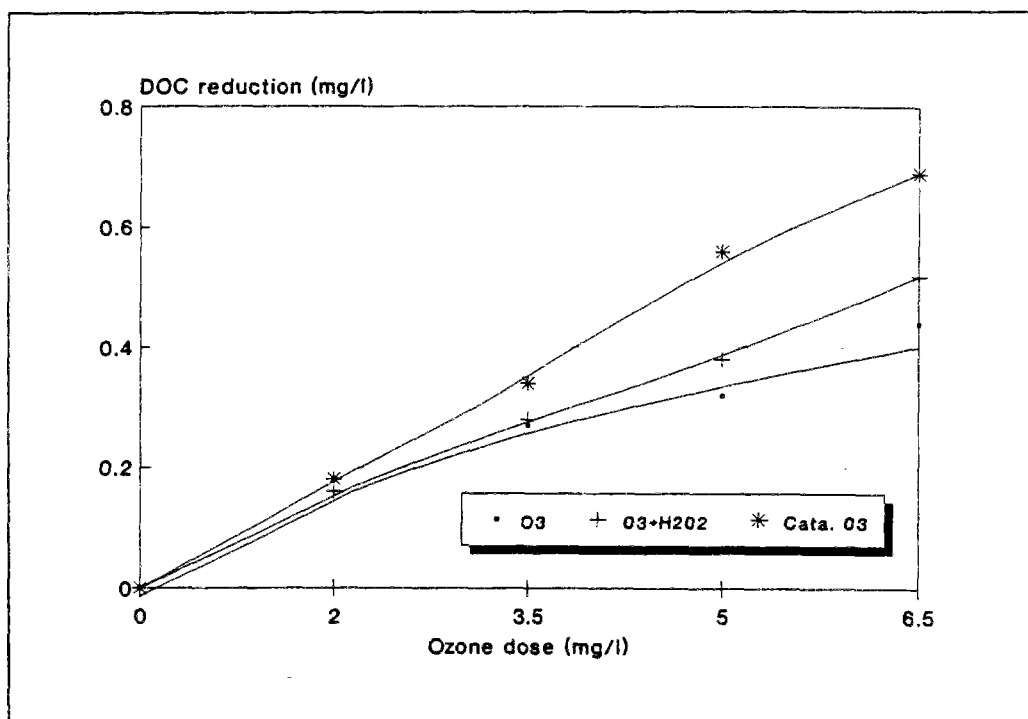


Fig. 3. DOC reduction versus applied ozone dose for a fulvic acid solution treated with ozone (O<sub>3</sub>), ozone hydrogen-peroxide (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), or catalytic ozone (Cata. O<sub>3</sub>).

The BDOC concentration of the fulvic acid solution was initially 8% of the DOC (BDOC = 0.23 mg/l), but increased to a maximum of 0.80 mg/l (ozone alone), 0.90 mg/l (ozone peroxide), or 0.60 mg/l (catalytic ozone) when the ozone dose was increased from 0 to 3.5 mg/l (Fig. 4). Catalytic ozone resulted in BDOC concentrations that were 30% less than with ozone alone. Little change was observed at higher ozone levels.

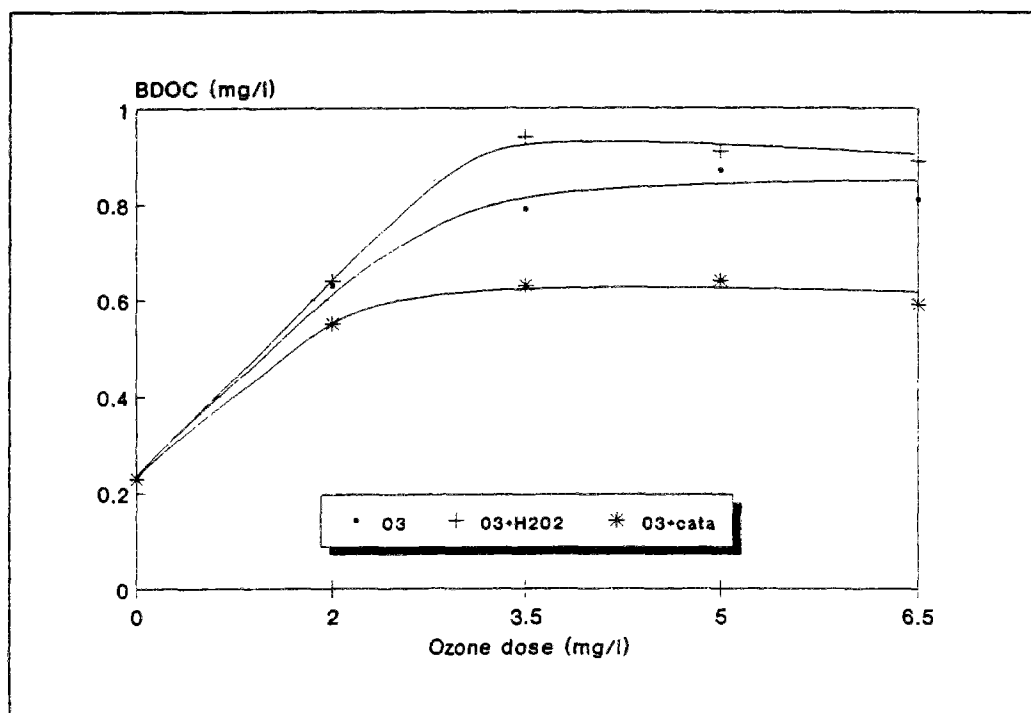


Fig. 4. BDOC versus applied ozone dose for a fulvic acid solution treated with ozone (O<sub>3</sub>), ozone hydrogen-peroxide (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), or catalytic ozone (Cata. O<sub>3</sub>).

RDOC values obtained with ozone and catalytic ozone were very similar. However, ozone peroxide seems to give appreciably lower values than the 2 other systems (Fig. 5). (0.10 - 0.20 mg lower for an ozone dose higher than 3.50 mg/l).

In this case, the optimum dose for BDOC formation was reached at a dose of 3 mg O<sub>3</sub> /l which corresponded to a ratio of 1 mg O<sub>3</sub>/mg DOC. This corresponded with a maximum ozone consumption and reduction in UV absorbance.

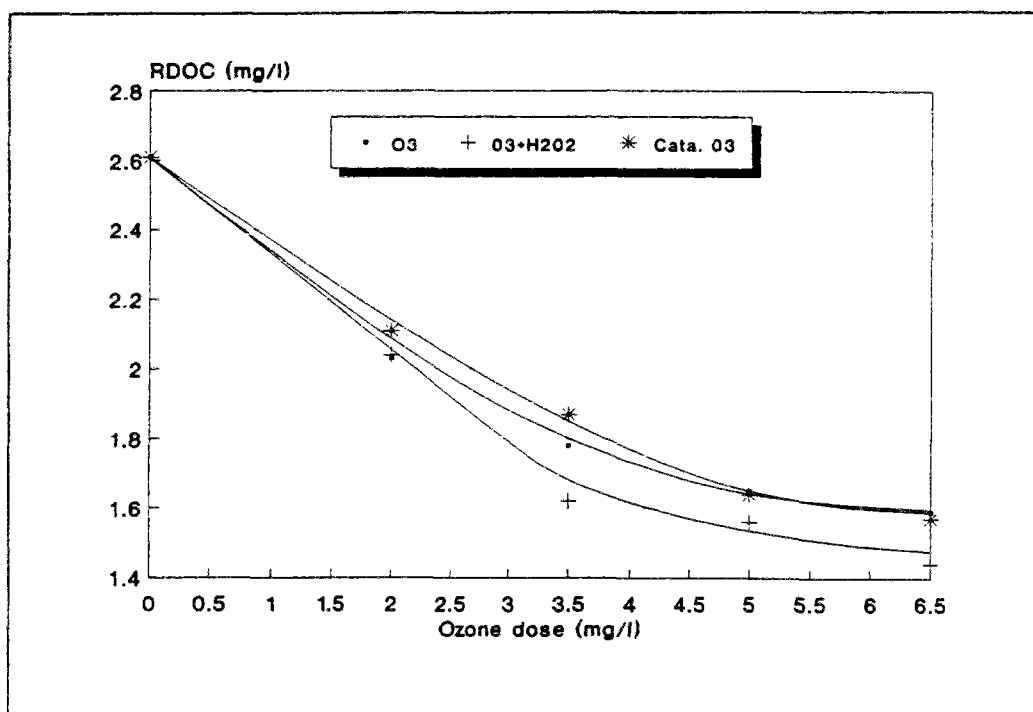


Fig. 5. RDOC versus applied ozone dose for a fulvic acid solution treated with ozone (O<sub>3</sub>), ozone hydrogen-peroxide (O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), or catalytic ozone (Cata. O<sub>3</sub>).

The values of chlorine demand before and after treatment with ozone, ozone hydrogen-peroxide and catalytic ozone are given in Table 1. Applied ozone dose was 5 mg/l. Chlorine demand decreased after ozone and catalytic ozone treatment. The reduction in chlorine demand was 16% and 44% over the initial value with ozone and catalytic ozone, respectively. On the contrary, chlorine demand increased with ozone hydrogen-peroxide treatment, although no hydrogen-peroxide residue was found in water sample.

In a previous study (Paillard *et al.*, 1991a) on Cebon Water (initial DOC of 5.7 mg/l), the DOC reduction with catalytic ozone was 50% (with an ozone relative rate= 0.88 mg O<sub>3</sub>/mg C) while ozone and ozone peroxide led to a low DOC reduction.

**Table 1:** Chlorine demand (chlorine dose = 2 mg/l; 1 hour contact time) for a fulvic acid solution treated with ozone ( $O_3$ ), ozone hydrogen-peroxide ( $O_3 + H_2O_2$ ), and catalytic ozone. Applied ozone dose = 5 mg/l.

| Treatment       | Chlorine demand (mg/l) |
|-----------------|------------------------|
| untreated water | 0.32                   |
| $O_3$           | 0.27                   |
| $O_3 + H_2O_2$  | 0.60                   |
| Catalytic ozone | 0.18                   |

Reaction mechanisms of ozone have been studied (Doré, 1989). Ozone reacts directly on aromatics, unsaturated organic compounds (double bonds  $C=C$ ,  $C=O$ ,  $C=S$ ,  $=N-H$ ) and amino compounds ( $-NH_2$ ) leading to the formation of saturated polycarbonaceous compounds (cycloaddition) and yielding methyl ceton, diacids, dialdehydes, aldehydes, acids and mineral compounds ( $CO_2$ ). The last stage explains the DOC reduction with ozone alone (Doré, 1989).

Catalytic ozone leads to a higher mineralization of organic compounds (25% of initial DOC compared to 15% with ozone alone for an applied ozone dose of 6.5 mg/l), which affects the BDOC produced by the ozone oxidation. BDOC production was 30% lower with catalytic ozone than with ozone alone.

Direct action of ozone on polycarbonaceous compounds such as alcohols, aldehydes and cetons is very low. The chemical reactions of catalytic ozone are still unknown but a previous

study (Paillard *et al.*, 1991a) has demonstrated that it does not make use of radical oxidation but could be a selective oxidation mechanism of carboxylic functions within two stages:

- an adsorption on the catalyst surface,
- an oxidation process on the catalyst surface.

Like ozone, ozone hydrogen-peroxide reacts on aromatic cycles, but moreover, it also reacts on aliphatic acids with  $\text{OH}^\circ$  radicals. Due to these conditions, mineralization is higher than with ozone alone. Radical action ( $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  system) seemed to increase chlorine demand of the fulvic acid solution (as found by Jadas-Hecart A. *et al.*, 1988), while direct action led to a decrease in chlorine demand. These differences suggest qualitative differences in the oxidation products generated by the three oxidative systems.

## CONCLUSIONS

The aim of this study was to compare the effect of 3 oxidant systems (ozone, ozone hydrogen peroxide (0.35 mg  $\text{H}_2\text{O}_2$  /mg  $\text{O}_3$ ) and catalytic ozone (10 g catalyst / l water sample)) on DOC mineralization and BDOC production for a fulvic acid solution. It showed that:

- For a 10 min. contact time, the optimum oxidant dose for BDOC production is about 1 mg  $\text{O}_3$  /mg DOC. BDOC values reached 0.80 mg/l and 0.90 mg/l with ozone and ozone peroxide system (for an initial BDOC of 0.23 mg/l).
- DOC mineralization reached 15% and 18% with ozone alone and ozone peroxide system respectively (applied ozone dose of 6.5 mg/l).
- Catalytic ozone increases the ozone consumption and led to a higher mineralization of organic compounds (reduction of 25% of initial DOC). It resulted in a reduction of BDOC production, compared to ozone alone which was due to the oxidation of ozone by-products

refractory to ozone alone. Moreover, the decrease in chlorine demand was maximum with the catalytic ozone system.

Catalytic ozone could be a solution to improve DOC removal from natural water (composed of natural organic acids such as fulvic acids) in water treatment plants. Further investigations will be done in order to explain the exact mechanism of oxidation.

### Acknowledgements

The authors wish to thank L. A. Kaplan (Stroud Water Research Center, Philadelphia) for his helpful comments on this manuscript.

### REFERENCES

- Al Hayek N. and Doré M. (1985). Oxydation des composés organiques par le reactif de Fenton, possibilités et limites. *Environ. Technol. Lett.*, **6**: 37-50.
- Al Hayek N. and Doré M. (1990). Oxydation des phénols par le peroxyde d'hydrogène en milieu aqueux en présence de fer supporté sur alumine. *Wat. Res.*, **24**: 973-982.
- Bader H. and Hoigne J. (1981). Determination of ozone in water by the carmin indigo method. *Wat. Res.*, **15**: 449-456.
- Bourbigot M.M., Brunet R., Zeana A., and Doré M. (1985). Utilisation simultanée de l'ozone et des rayons UV en traitement de l'eau. *IOA Wasser Kongress*, Berlin, April 23-24.
- Brunet R., Bourbigot M.M. and Doré M. (1984). Oxidation of organic compounds through the combination ozone-hydrogen peroxide. *Ozone Sci. Engrg.*, **6**:163-183.
- Doré M. (1989). Chimie des oxidants et traitement des eaux. *Technique et documentation*, Lavoisier ed., Paris. 505p.
- Eisenberg G. (1943). Colorimetric determination of hydrogen peroxide. *Ind. Engng Chem.*, **15** : 327-328.

Hoigne J. and Bader H. (1976). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Wat. Res.*, **10**: 377-386.

Jadas-Hecart A., Ventresque C., Legube B. and Doré M. (1988). Effect of ozonation on the chlorine demand of a treated surface water and some macromolecular compounds. *Proc. Int. Conf. on Ozone in Water Quality management*. IOA, Zürich, Switzerland.

Joret J.C. and Levi Y. (1986). Méthode rapide d'élimination du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, **510**: 3-9.

Langlais B., Rechow D.A. and Brink D.R.eds. (1991). Ozone in water treatment. Application and engineering. *AWWA Res. Fond. - Lewis publisher*, 569p.

Paillard H. (1990). Elimination of atrazine by a combined ozone hydrogen peroxide treatment on the Seine river. *Proc. 6th European Symp. on organic micropollutants in the aquatic environment*. Lisbon, Portugal, May 22-24.

Paillard H., Doré M. and Bourbigot M.M. (1991a). Les perspectives d'application de l'ozone catalytique en traitement des eaux à potabiliser. *10th Ozone World Congress*, IOA, Monaco, March 19-21.

Paillard H., Carbonnier F. and Roche P. (1991b). Oxydation des pesticides par ozonation en présence d'un catalyseur hétérogène. *Conf. ACS. Emerging Technologies for hazardous waste management*. Atlanta, October 1-3.

Roche P., Volk C., Carbonnier F. and Paillard H. (1993). Water oxidation by ozone or ozone - hydrogen peroxide using the "Ozotest" or "Peroxotest" methods. *Ozone Sci. Engrg.*, in press .

Rodier J. (1984). L'analyse de l'eau. (Eaux naturelles - Eaux résiduares - Eaux de mer). 7 th ed.; DUNOS ed.

Thurman E.M. and Malcolm R.L. (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, **45**: 463-466.

Xiong F. (1988). Contribution à l'étude de l'ozonation des acides fulviques aquatiques. *Thèse de Doctorat, chimie et microbiologie de l'eau*. Université de Poitiers, N° 383.





## **Chapitre III**

**CODB et recroissance  
bactérienne le long des  
réseaux de distribution**

**(Etude de terrain)**



## Situation du problème et objectifs de l'étude.

La MOB non éliminée lors des traitements de potabilisation constitue une source d'énergie et de carbone pour les bactéries, ce qui va entraîner une prolifération de ces germes dans les réseaux de distribution (Van der Kooij *et al.* 1982; Levi, 1990; LeChevallier *et al.*, 1991; Mathieu *et al.*, 1992; Servais *et al.*, 1992). Les incidences de cette prolifération bactérienne sont de plusieurs ordres. Elles concernent la dégradation des qualités organoleptique et bactériologique de l'eau (risque de dépassement des normes de potabilité), l'accélération des processus de corrosion et la mise en place d'une chaîne trophique (Allen *et al.*, 1980; Levy *et al.*, 1986; Coallier *et al.*, 1989; Fransollet et Masschelein, 1992). La prolifération des micro-organismes (ou reviviscence bactérienne) affecte non seulement la flore hétérotrophe aérobie mésophile des réseaux de distribution mais aussi dans certains cas des germes considérés habituellement comme indicateurs sanitaires tels que les coliformes (Goshko *et al.*, 1983; Bourbigot *et al.*, 1984; LeChevallier *et al.*, 1987; Geildreich et Rice, 1987; Payment *et al.*, 1988). Elle intervient essentiellement dans le biofilm qui s'établit à la surface eau-canalisation. La quantité de bactéries dans le biofilm est à relier à deux phénomènes, d'une part le dépôt-relargage de bactéries et d'autre part, la multiplication cellulaire des cellules fixées. (Bryers, 1987) (Figure 1).

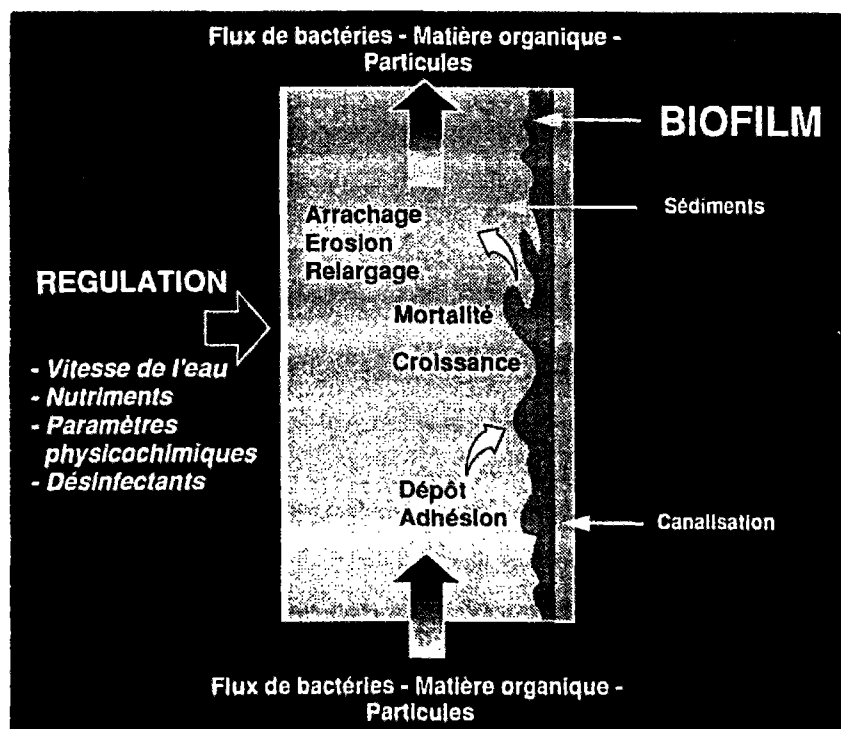


Figure 1: Représentation schématique de la formation d'un biofilm à la surface d'une canalisation (d'après Block *et al.*, 1990).

Les réseaux de distribution se comportent comme des réacteurs biologiques complexes. Il est en effet difficile de définir une loi simple régissant le système matière organique-microorganismes ainsi que de prévoir l'ensemble des interactions entre les caractéristiques générales de l'eau (facteurs physiques, chimiques et biologiques), et les caractéristiques propres au réseau de distribution (conception, dimensionnement, matériaux, exploitation...) sur la recroissance bactérienne.

Nous avons en conséquence réalisé une étude de terrain qui avait pour objectifs:

- de préciser les mécanismes responsables de la reviviscence bactérienne (flore bactérienne totale, coliformes) le long d'un réseau de distribution de taille réelle.
- d'élaborer un modèle de risque d'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution (modèle AL COL) à partir d'un calcul de risques croissants d'observation de ces germes.

L'étude a consisté à suivre hebdomadairement pendant un an (Février 1991- Février 1992), les paramètres bactériologiques (dénombrement de la flore bactérienne totale par microscopie en épifluorescence ou par culture sur milieu gélosé) et certains paramètres physico-chimiques (température, résiduel de chlore, carbone organique dissous biodégradable) dans l'eau en sortie de l'usine de Méry sur Oise et sur cinq sites répartis sur l'ensemble d'un réseau de distribution de la banlieue parisienne desservi par cette usine .

Le modèle AL COL a ensuite été mis en application lors d'une étude complémentaire qui a été basée sur le contrôle hebdomadaire pendant 21 semaines (Avril - Septembre 1992) de 7 et 10 points de prélèvement situés sur 2 réseaux alimentés respectivement par les usines de Méry sur Oise et de Neuilly sur Marne.

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles: "*Evolution de la qualité bactériologique et de la teneur en matière organique biodégradable le long d'un réseau de distribution.*" et "*Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation.*"

## Références bibliographiques

- Allen M.J., Taylor R.H. and Geldreich E.E., 1980. The occurrence of microorganisms in water main encrustations. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **72**: 614-625.
- Block J.C., Hartemann P. et Colin F., 1990. Accumulation de biofilms dans les réseaux de distribution. *Compte rendu séminaire R2Eau: évolution de la qualité de l'eau au cours de la distribution. Choisy le Roi, France* (11 juin): 12-16.
- Bourbigot M.M., Dodin A., et Lheritier R., 1984. La flore bactérienne dans un réseau de distribution. *Wat. Res.*, **18**: 585-591.
- Bryers J.D., 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistance of biofilm. *Biotechnol. Progress.*, **3**: 57-68.
- Coallier J., Lafrance P., Duchesne D., et Lavoie J., 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable. *Sci. Tech. Eau*, **22**: 63-72.
- Fransolet G. et Masschelein W.J., 1992. Evolution de la flore bactérienne et germes tests des eaux en réseau. *T.S.M. l'Eau*, **6**: 315-320.
- Geldreich E.E., and Rice E.W., 1987. Occurrence, significance and detection of *Klebsiella* in water systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **79**: 74-80.
- Goshko M.A., Pipes W.O., and Christian R.R., 1983. Coliforms occurrence and chlorine residual in small water distribution systems. *J. Am. Wat. Works Ass.*, **75**: 371-374.
- LeChevallier M.W., Babcock T.M., and Lee R.G., 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Envir. Microbiol.*, **53**: 2714-2724.
- LeChevallier M.W., Shulz W. and Lee R.G., 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**: 857-862.
- Levi Y., 1990. Importance du contrôle du carbone organique dissous bioéliminable (CODB) dans la stratégie de maintien de la qualité de l'eau potable en cours de distribution. *Compte rendu 2<sup>e</sup> atelier sur l'eau potable, AQTE- Montréal*: 273-282.
- Levy R.V., Hart F.L. and Cheetham R.D., 1986. Occurrences and public health significance of invertebrates in drinking water systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **78**: 105-110.

Mathieu L., Paquin J.L. Block, J.C. Randon, G. Maillard, J. et Reasoner D., 1992. Paramètres contrôlant la prolifération des bactéries dans les réseaux de distribution. *Sci. Eau* 5: 91-112.

Payment P., Gamache F., and Paquette G., 1988. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. *Can. J. Microbiol.*, 34: 1304-1309.

Servais P., Billen G., Laurent P., Levi Y., et Randon G., 1992. Etude de la dynamique du CODB et des bactéries dans un réseau de distribution de la banlieue Nord de Paris. *Sci. Eau*, 5: 69-89.

Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, 84: 57-65.

Van der Kooij, D., Wisser A. and Hijnen W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Wtr. Works. Ass.* 74 : 540-545.

# **Evolution de la Qualité Bactériologique et de la Teneur en Matière Organique Biodégradable le Long d'un Réseau de Distribution.**

**Christian VOLK\*, Coralie ROBERT\*, Françoise DUPRES<sup>+</sup> et Jean-Claude JORET\***

**\*: ANJOU RECHERCHE, Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux. Chemin de la digue, BP 76. 78600 Maisons - Laffitte. France.**

**+ : COMPAGNIE GENERALE DES EAUX, 52 rue d'Anjou. 75008 Paris. France.**

**Soumis à *Canadian Journal of Microbiology* (Décembre 1993)**



### **Résumé.**

Ce travail a été réalisé afin de mieux comprendre le phénomène de reviviscence bactérienne le long des réseaux de distribution, source de problèmes pour les traiteurs d'eau. Cette étude a donc consisté à suivre hebdomadairement, pendant un an, la qualité bactériologique de l'eau (flore bactérienne totale, coliformes), la température, le résiduel de chlore, et le carbone organique dissous biodégradable dans l'eau à la sortie de l'usine de traitement et sur 5 sites répartis sur l'ensemble d'un réseau de distribution de la banlieue nord de la région parisienne. La recroissance bactérienne a répondu à une logique dont les trois paramètres clés étaient la température de l'eau, la présence de désinfectant et la teneur en matière organique biodégradable. Les variations de la qualité bactériologique de l'eau évaluée par dénombrement microscopique en épifluorescence et par culture sur milieu R2A ont été prédites à 63% et 72% par un modèle de régression linéaire multiple incluant la température de l'eau et sa concentration de chlore résiduel. De même, la consommation de CODB enregistrée le long du réseau a été prédite à 54% à partir de deux paramètres, la température et la teneur en CODB dans l'eau en sortie de l'usine de potabilisation. Une consommation de 0,1 mg de CODB s'est traduit par une augmentation des bactéries en suspension de l'ordre de  $10^4$  bactéries/ml.

### **Mots clés**

Réseau de distribution - Recroissance bactérienne - Température - Résiduel de chlore - Carbone organique dissous biodégradable (CODB).

### **Summary**

This work was undertaken in order to understand bacterial regrowth in distribution systems which is a problem for water utilities. In this study, bacterial quality, temperature, residual chlorine and biodegradable dissolved organic carbon were measured weekly in the water treatment plant effluent and at five distribution sites of a distribution system in the North of Paris suburbs. Bacterial regrowth increased with water temperature, absence of residual

chlorine and biodegradable organic matter. Multiple linear regression models including water temperature and residual chlorine level could explain 63 and 72 % of the variation in bacterial densities (epifluorescent counts and Heterotrophic plate counts respectively). A model, which included temperature and BDOC content in treatment plant effluent was able to predict 54 % of BDOC consumption along the network. A BDOC consumption of 0.1 mg/l resulted in an increase in the bacterial density of about  $10^4$  bacteria/ml.

#### **Key words**

Distribution system - Bacterial regrowth - Temperature - Residual chlorine - Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC).

## Introduction

L'augmentation des dénombrements bactériens le long des réseaux de distribution, souvent appelée reviviscence bactérienne, entraîne une détérioration de la qualité bactériologique de l'eau, l'apparition de mauvais goûts, d'odeurs ou de couleur, et l'accélération du processus de corrosion des canalisations (Allen *et al.* 1980; Bouwer et Crowe 1988; Coallier *et al.* 1989). Une chaîne alimentaire peut se développer jusqu'au stade des macro-invertébrés (Levy *et al.* 1986).

La dégradation de la qualité bactériologique des eaux se manifeste le plus souvent par des augmentations des dénombrements de la flore aérobie mésophile (*Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*...) (Bourbigot *et al.* 1984; Le Chevallier *et al.* 1987; Payment *et al.* 1988) et parfois par l'apparition de coliformes (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*...) (Goshko *et al.* 1983; Geldreich et Rice 1987; Le Chevallier *et al.* 1987; LeChevallier 1990; Camper *et al.* 1991b). Les bactéries présentes dans l'eau proviennent majoritairement du biofilm établi à la surface des canalisations ou sur des matières en suspension (Van der Werde *et al.* 1989).

L'accumulation des micro-organismes dans le biofilm est gouvernée par trois processus: les processus de dépôt, de métabolisme et de détachement des bactéries (Bryers et Characklis 1982; Bryers 1987; Haudidier *et al.* 1988; Block *et al.* 1993a).

Les micro-organismes qui adhèrent à la surface d'une canalisation peuvent avoir comme origines l'usine de traitement (la densité du biofilm diminuerait de 100 à 1000 fois avec la suppression totale des cellules entrant dans le réseau (Block *et al.* 1993b)), la recroissance de cellules du biofilm existant dans le réseau de distribution ou des interventions externes lors de travaux. Le processus de métabolisme se caractérise par des phénomènes de multiplication et de mortalité des bactéries fixées sur une canalisation. Des paramètres tels que la vitesse de l'eau, le temps de résidence de l'eau, la température, le pH, la teneur en nutriments ou la présence de désinfectants régulent le développement du biofilm (Martin *et al.* 1982; Le

Chevallier *et al.* 1987; Donlan *et al.* 1988; Camper *et al.* 1991a; Mathieu *et al.* 1992; Servais *et al.* 1992).

Il a été possible de relier la densité de bactéries fixées dans le biofilm et la dynamique des bactéries en suspension dans l'eau. En effet, sur plusieurs réseaux de distribution français, une densité de biofilm de  $10^7$  bactéries/cm<sup>2</sup> a correspondu à  $5-6 \times 10^4$  bactéries/ml (Servais *et al.* 1993). Dans un réseau expérimental (Nancy, France), les valeurs des dénombrements des bactéries en suspension et fixées ont été respectivement de  $10^3-10^5$  bactéries/ml et de  $10^6$  bactéries/cm<sup>2</sup> (Mathieu *et al.* 1992).

La concentration en matière organique biodégradable est un paramètre important dans la recroissance bactérienne (Le Chevallier *et al.* 1990b, 1991; Van der Kooij 1992; Mathieu *et al.* 1992). Les bactéries hétérotrophes utilisent le carbone organique pour la production de nouveau matériel cellulaire et comme source d'énergie. La matière organique de l'eau est constituée principalement de substances humiques, d'hydrates de carbone, de protéines et d'acides carboxyliques (Thurman et Malcolm 1981). Sa fraction biodégradable peut être évaluée par différentes méthodes basées sur deux concepts: le carbone organique facilement assimilable (COA) et le carbone organique dissous biodégradable (CODB) (Huck, 1990). La mesure du CODB repose sur le suivi de la décroissance du carbone organique dissous dans un échantillon d'eau incubé en présence de bactéries fixées (Joret et Levi, 1986) ou en suspension (Servais *et al.* 1987). Le COA représente généralement de 0,1 à 9 % du carbone organique dissous (Van Der Kooij *et al.* 1982). Les teneurs en CODB des eaux distribuées (obtenues après traitement d'eaux de surface de la région parisienne) sont généralement de 0.2 à 1 mg/l (soit 10-52% de la matrice organique) (Joret et Volk 1993). La consommation de CODB le long d'un réseau de distribution provoque une augmentation du nombre de bactéries fixées et en suspension (Mathieu *et al.* 1992). Plus la teneur en CODB dans l'eau produite en sortie d'usine est élevée, plus la consommation de CODB est forte. Une concentration de 0,35 mg/l de CODB en sortie d'usine a conduit à une consommation de 0,10 mg/l dans un réseau (Servais *et al.* 1992).

Par ailleurs, les bactéries du biofilm sont très résistantes à l'action bactéricide du chlore (Le Chevallier *et al.* 1988, 1990a; Mathieu *et al.* 1992). A titre d'exemple, la densité du biofilm dans un réseau de distribution expérimental (Nancy, France) en présence d'un résiduel de chlore libre de 0,5 mg/l a été évalué à  $10^5$  bactéries/cm<sup>2</sup> (dénombrements bactériens en épifluorescence) dont environ  $10^3$  bactéries/cm<sup>2</sup> étaient capable de croître sur milieu gélosé. Les bactéries présentes dans la phase eau ont été deux fois plus sensibles à la présence de chlore que les bactéries du biofilm (Mathieu *et al.* 1992). Par ailleurs pour une concentration en oxydant résiduel identique, le chlore a été 5 fois plus efficace que les chloramines pour la désinfection du biofilm (Mathieu *et al.* 1992).

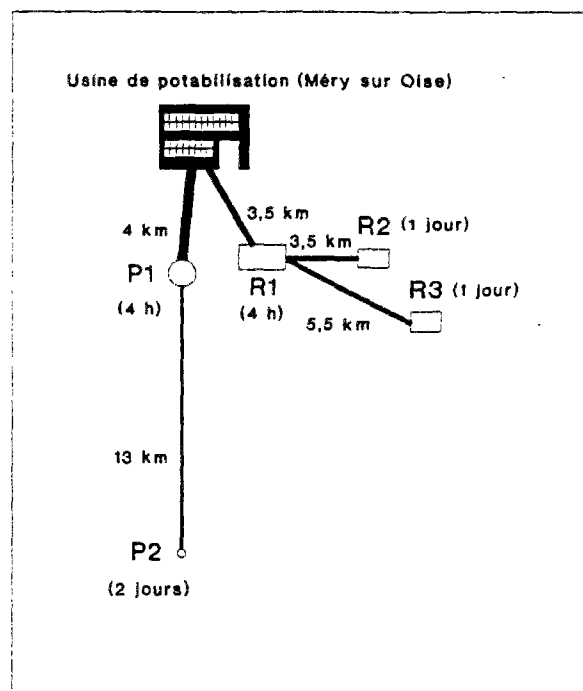
Les objectifs de cette étude étaient de quantifier le phénomène de reviviscence bactérienne le long d'un réseau de distribution et de vérifier l'influence des différents facteurs physico-chimiques (température, résiduel de chlore total, concentration en matière organique biodégradable) qui régissent la recroissance bactérienne (dénombrement de la flore bactérienne en suspension et des coliformes).

## **Matériels et méthodes.**

### **1) Réseau de distribution étudié.**

L'étude a porté sur le contrôle de l'eau en sortie de l'usine de potabilisation de Méry sur Oise, dont les caractéristiques ont été précédemment décrites (Ventresque et Bablon 1989) et sur 5 points du réseau de distribution alimenté par cet ouvrage (Figure 1):

- le site P1 est situé à 4 km de l'usine de traitement. Le point de prélèvement est localisé sur une canalisation principale (diamètre de 1 m). Le temps de séjour de l'eau dans le réseau à ce point a pu être estimé à quelques heures.



**Figure 1 :** Représentation schématique des 5 sites du réseau de distribution étudié.

*Prélèvement au niveau d'une canalisation: P1 et P2.*

*Prélèvement au niveau d'un réservoir: R1, R2 et R3.*

*( ) : temps de séjour approximatif de l'eau.*

- le point de prélèvement P2 est situé à 17 km de l'usine, à l'extrémité du réseau, sur une canalisation de faible diamètre ( 0,2 m). Pour ce site, le temps de séjour de l'eau est de 1-2 jours.

- le site R1 est un réservoir (12 000 m<sup>3</sup>) situé à 3,5 km de l'usine (temps de séjour de l'eau de quelques heures). L'eau est ensuite répartie dans deux autres réservoirs (R2: 700 m<sup>3</sup>, R3: 5 000 m<sup>3</sup>) situés respectivement à 7 et à 9 km de l'ouvrage de traitement. Pour ces 2 sites, le temps de séjour de l'eau dans le réseau est d'environ 1 jour.

Les paramètres bactériologiques (dénombrement microscopique en épifluorescence, dénombrement des germes cultivables sur gélose R2A, dénombrement des coliformes) et physico-chimiques (température, résiduel de chlore, carbone organique dissous biodégradable) ont été contrôlés dans l'eau en sortie d'usine et sur les 5 sites chaque semaine de Février 1991 à

Février 1992 (semaines 6 à 52 (1991), et semaines 1 à 5 (1992)) (sortie usine - sites R1 et P1: n=50; sites P2 et R2: n=47; site R3: n=48). Afin de respecter le temps de résidence de l'eau, l'échantillonnage a été réalisé avec un décalage de 4 heures par rapport à l'usine de traitement pour les sites P1 et R1, 1 jour pour les réservoirs R2 et R3, et 2 jours pour le site P2.

## **2) Paramètres bactériologiques.**

Les échantillons d'eau destinés aux analyses bactériologiques ont été collectés dans des flacons stériles de 500 ml contenant 10 mg de thiosulfate de sodium.

### *a) Dénombrements microscopiques en épifluorescence. (EPI)*

Les dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence ont été réalisés à partir d'une prise d'échantillon de 50 ml fixée par du formaldéhyde (concentration finale 2%) et stockée à 4°C jusqu'à l'analyse.

Les échantillons d'eau (3 - 10 ml) ont été filtrés au travers d'une membrane en polycarbonate noire (Millipore, porosité = 0,2 µm, diamètre = 25 mm). Les bactéries retenues sur la membrane ont été colorées pendant 10 min. avec 2 ml d'une solution d'orangé d'acridine à 30 µg / ml (Merk ref. 1333). Les dénombrements ont été réalisés par observation de 20 champs microscopiques (microscope Leitz, dialux 20, grossissement 630 x) sous excitation UV (Orsam, HBO 50W). Les résultats sont exprimés en bactéries par ml (Bact./ml)

### *b) Dénombrement de la flore hétérotrophe aérobie mésophile cultivable sur milieu gélosé.*

Les bactéries revivifiables ont été dénombrées après inclusion de 1 ml d'échantillon pur ou dilué dans une gélose R2A (Difco, ref. 1826-17-1) incubée à 20°C pendant 11 jours (R2A20).

Les résultats sont exprimés en unités formant colonie par ml (UFC/ml).

### *c) Dénombrement des coliformes.*

Les coliformes ont été dénombrés selon la méthode AFNOR NFT 90 414 par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm (Sartorius, nitrate de cellulose, diamètre = 50 mm). Les membranes ont été incubées sur milieu TTC tergitol (Inst. Pasteur, ref. 64457), à 37°C

pendant 48 h (coliformes totaux) et à 44°C pendant 24 h (coliformes thermotolérants). Tous les coliformes présumés apparaissant à 37°C ont été confirmés par le test oxydase. Les résultats sont exprimés en UFC/100 ml.

### **3) Mesure du CODB et calcul de la consommation de CODB entre l'usine de traitement et un site de prélèvement.**

Le prélèvement des échantillons destinés à la mesure du carbone organique dissous biodégradable a été effectué dans des flacons en verre brun de 500 ml traités à 550°C pendant quatre heures pour éviter toute contamination carbonée des échantillons.

Le CODB a été mesuré au laboratoire par incubation des échantillons d'eau en présence d'un inoculum de bactéries fixées sur du sable selon la méthode décrite par Joret et Levi (1986). La consommation de CODB le long du réseau entre l'usine et chaque site de prélèvement ( $CODB_{cons.}$ ) a été obtenue par différence entre la valeur de CODB enregistrée dans l'eau produite en sortie d'usine de traitement et celles mesurées sur chacun de ces sites.

### **4) Paramètres physico-chimiques.**

La température de l'eau (°C) a été mesurée en continu à la sortie de l'usine de traitement.

Le résiduel de chlore total a été analysé au moment du prélèvement par la méthode à la diéthyl-paraphénylène - diamine (DPD) (Rodier 1984).

## **Résultats**

Nous étudierons successivement l'influence de la température et de la présence de chlore sur l'apparition des coliformes, les variations spatiales de la recroissance bactérienne (dénombrements en épifluorescence et par culture sur gélose R2A) et de la consommation de CODB le long du réseau de distribution. A titre d'information, les caractéristiques moyennes de l'eau produite en sortie d'usine après traitement de l'eau de l'Oise ont été données dans le tableau 1.



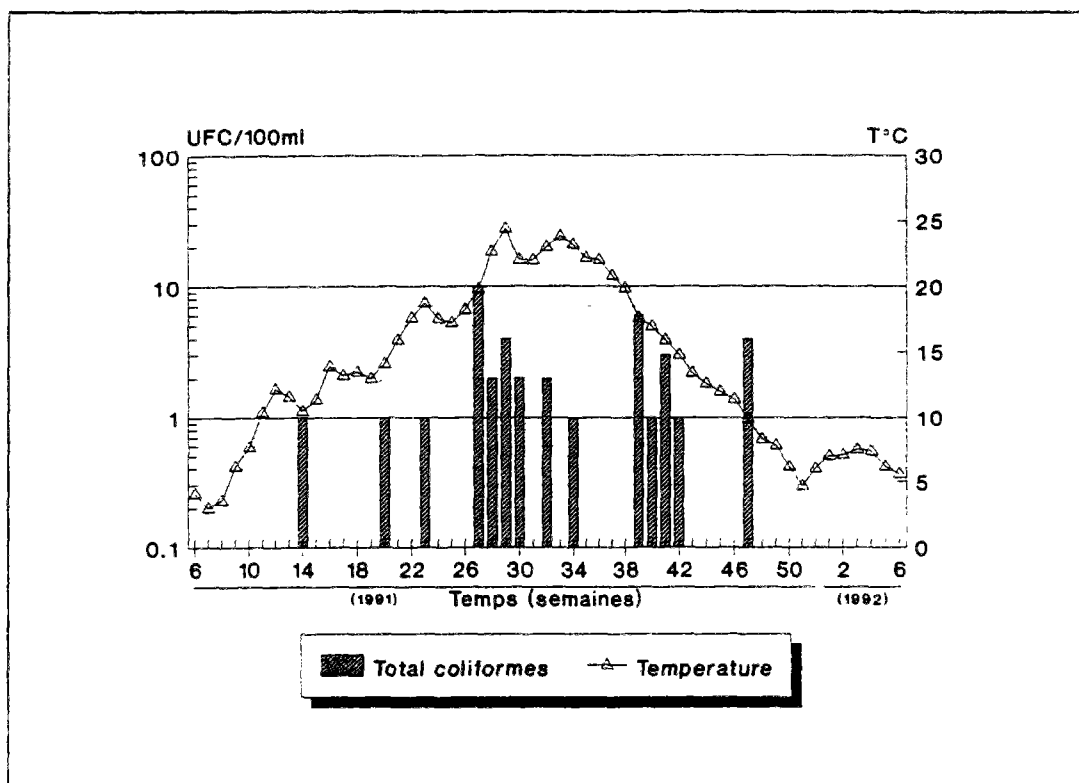
Tableau 1: Caractéristiques de l'eau produite en sortie d'usine de traitement pendant l'étude (Février 1991- Février 1992) (n=50).

|   | Moyenne<br>( $\sigma$ ) | Minimum | Maximum |
|---|-------------------------|---------|---------|
| COD<br>(mg/l)   | 2,55<br>(0,35)          | 1,99    | 3,66    |
| CODB<br>(mg/l)  | 0,86<br>(0,25)          | 0,37    | 1,34    |
| Résiduel de chlore total<br>(mg/l)  | 0,42<br>(0,04)          | 0,32    | 0,55    |
| Turbidité<br>(NTU)  | 0,16<br>(0,04)          | 0,10    | 0,25    |
| Dénombrement des bactéries par<br>microscopie en épifluorescence<br>( $\times 10^4$ Bact./ml) | 5,3<br>(2,4)            | 1,5     | 13      |
| Dénombrement des germes cultivables<br>(R2A20)<br>(UFC/ml)                                    | 5<br>(13)               | 0       | 70      |
| Dénombrement des coliformes totaux<br>(UFC/100ml)   | 0                       | 0       | 0       |

### 1) Apparition des coliformes

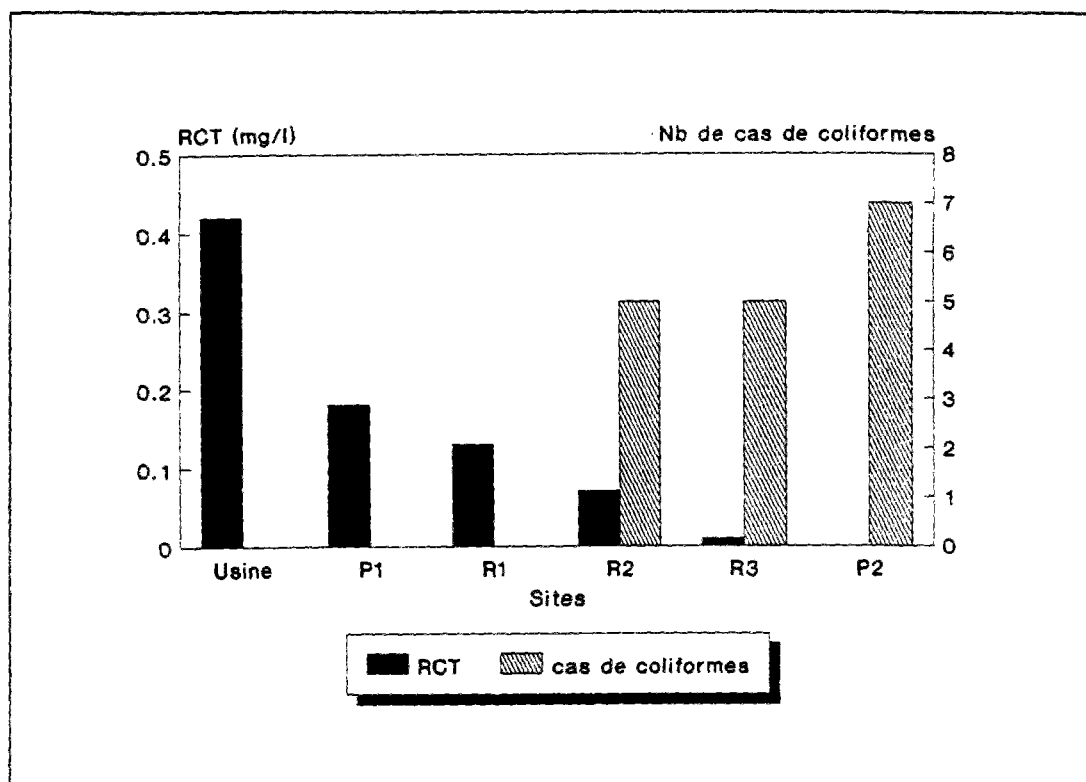
L'évolution de la température de l'eau et le nombre de coliformes (coliformes totaux) observés sur les 5 sites pendant l'année d'étude ont été reportés sur la figure 2. Au total, 242 analyses de recherche de coliformes ont été réalisées, parmi lesquelles 17 se sont révélées positives (soit 7,2%). La densité de coliformes n'a jamais été supérieure à 7 UFC/100 ml sur les sites où les coliformes sont apparus. Ces germes ont été isolés simultanément sur deux sites en 3 occasions seulement (semaines 27, 29 et 39). Dans la majorité des cas (13 cas sur 17), l'apparition des coliformes a été associée à une température de l'eau supérieure à 15°C (semaines 21 à 41). Les

quatre autres cas d'apparition de coliformes (semaines 14, 20, 42 et 47) ont correspondu à des températures de l'eau comprises entre 10°C et 15°C.



**Figure 2:** Variation de la température de l'eau et du nombre de coliformes observés sur les différents sites.

La figure 3 représentant le nombre de cas d'observation de coliformes et la concentration moyenne en résiduel total de chlore sur chaque site indique qu'aucun cas de coliformes n'a été observé dans l'eau produite en sortie d'usine (concentration moyenne en chlore résiduel total de  $0,42 \pm 0,04$  mg/l) et sur les 2 sites P1 et R1 (concentrations moyennes de résiduel de chlore total respectivement de  $0,18 \pm 0,03$  mg/l et de  $0,12 \pm 0,06$  mg/l). Les coliformes ont été isolés sur les points de prélèvement du réseau (R2, R3 et P2) les plus éloignés de l'usine où la concentration moyenne de chlore résiduel total au cours de l'année était faible ou nulle. Dans tous les cas d'observation de coliformes sur un site donné, la concentration en résiduel de chlore total a toujours été inférieure à 0,10 mg/l.

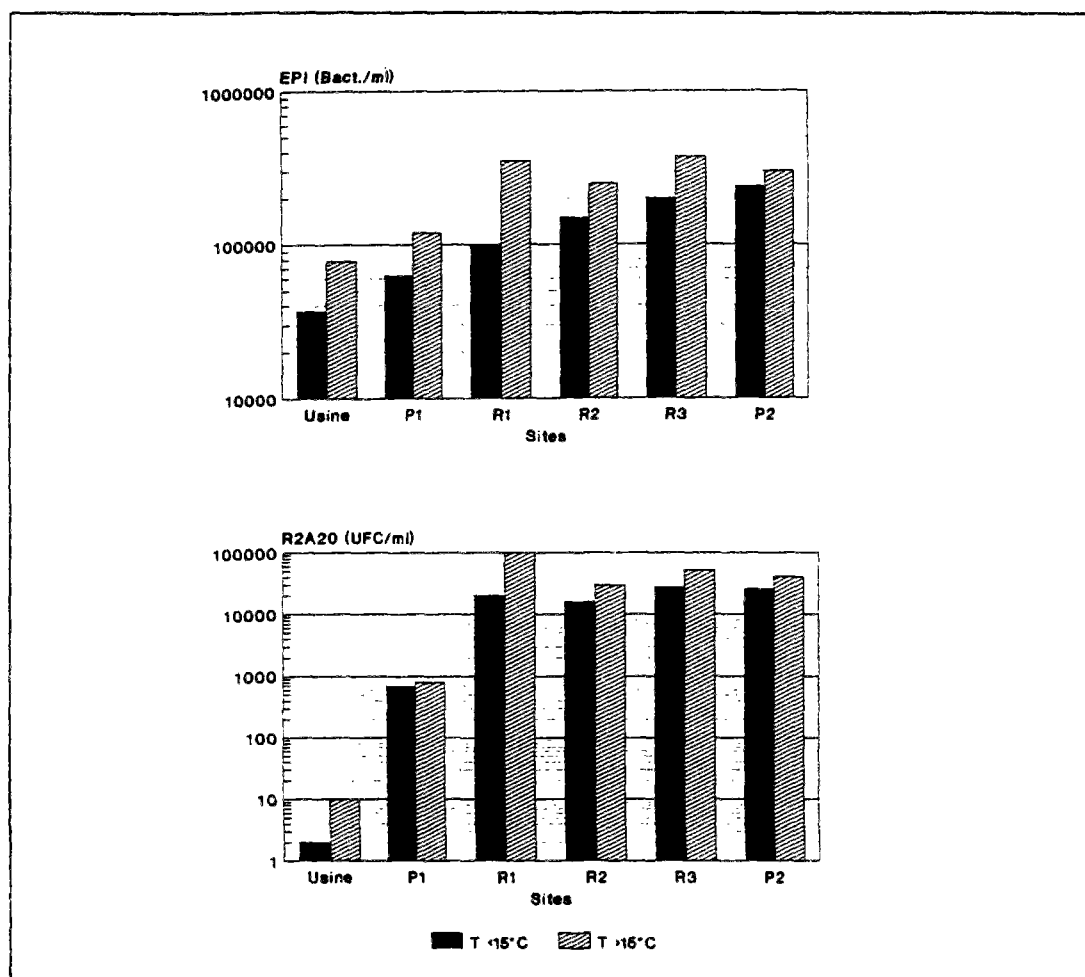


**Figure 3:** Moyenne des valeurs de résiduel de chlore total (RCT) et nombre de cas de coliformes observés sur les différents sites pendant l'année d'étude.

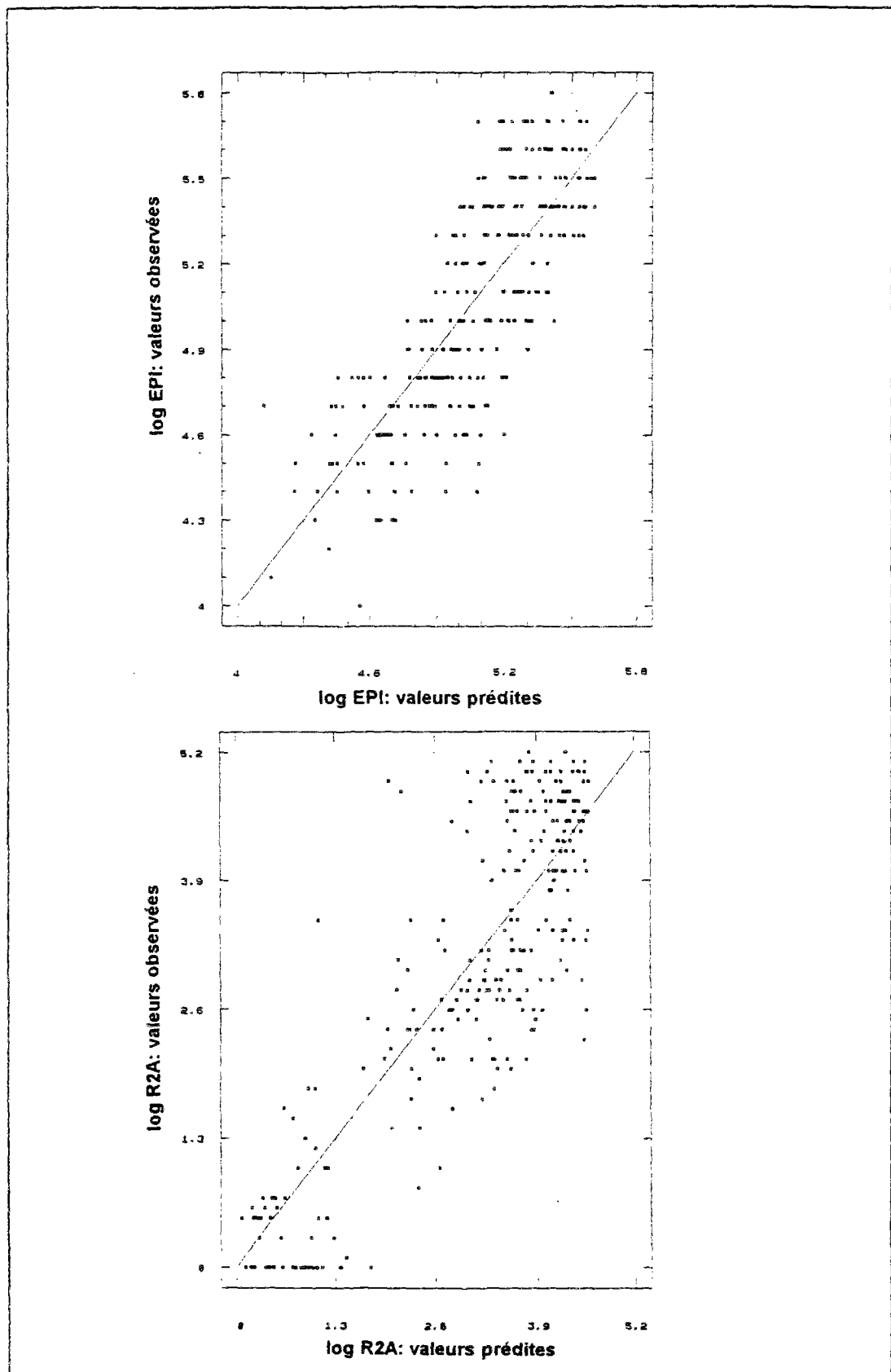
## 2) Variation de la flore bactérienne en suspension dans l'eau.

La figure 4 représente la moyenne des valeurs de dénombrements de la flore bactérienne en suspension (EPI et R2A20) enregistrée sur les différents sites, pour des températures de l'eau inférieures ou supérieures à 15°C. Cette valeur seuil de température de l'eau de 15°C a correspondu en effet aux apparitions les plus fréquentes de coliformes sur le réseau (Figure 2). De telles augmentations de la flore bactérienne de l'eau et de la fréquence d'apparition des coliformes à partir de températures de l'eau supérieures à 15°C ont été mentionnées par LeChevallier *et al.* (1991) et Camper *et al.* (1991a). Au cours de cette étude, les résultats de dénombrements de la flore bactérienne en suspension par microscopie en épifluorescence ont été de 1,5 à 2 fois plus forts (sortie d'usine, sites P1, P2, R2 et R3) et de 3,5 fois plus forts (site R1) lorsque la température de l'eau était supérieure à 15°C. Cette même tendance a été observée pour les dénombrements bactériens par culture sur gélose R2A. Pour ce paramètre, la

moyenne des valeurs a été 1,5 à 2 fois plus forte pour les sites R2, R3 et P2, et 5 fois plus forte en sortie d'usine et pour le site R1 quand la température de l'eau était supérieure à 15°C. Quelle que soit la température de l'eau, les valeurs de dénombrements bactériens ont toujours été plus fortes sur le réseau qu'en sortie d'usine. Ces valeurs ont été d'autant plus fortes que les sites étaient plus éloignés de l'usine de traitement. Ce phénomène est à relier à la diminution progressive de la concentration en résiduel de chlore total (mentionnée sur la figure 3) et à l'augmentation du temps de séjour de l'eau.



**Figure 4:** Moyennes des valeurs de dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence (EPI) et sur milieu de culture R2A (R2A20) sur les différents sites pour des températures de l'eau supérieures ou inférieures à 15°C.



**Figure 5:** Correspondance entre les valeurs prédites (modèles de régression linéaire [1] et [2]) et les valeurs observées des dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence (log EPI, Fig. 5a) ou par culture sur milieu R2A (log R2A, figure 5b) sur l'ensemble des sites étudiés.

Une relation entre le logarithme des valeurs de dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence ( $\log EPI$ , Bact./ml) ou par culture sur milieu R2A ( $\log R2A20$ , UFC/ml), le résiduel de chlore total (RCT, mg/l) et la température de l'eau (T, °C) a pu être établie. Les formules obtenues à partir de modèles de régression linéaire multiple sont les suivantes:

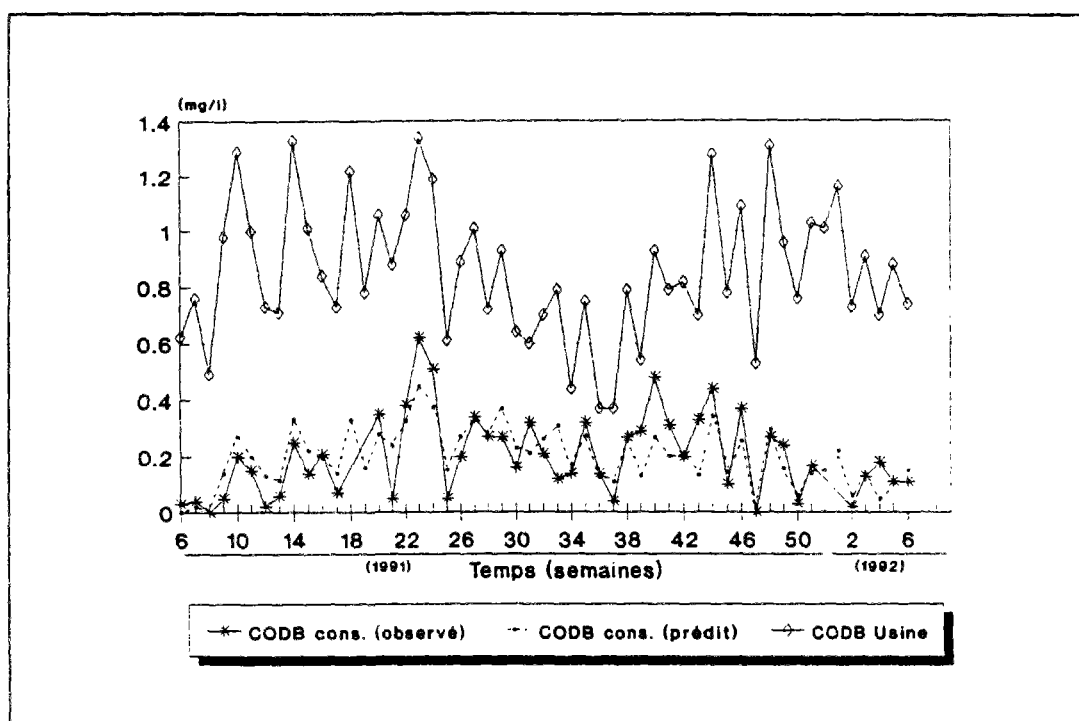
$$[1] \quad \log EPI = -1,55 \times RCT + 0,03 \times T + 4,88 \quad (r^2 = 0,63; n=292)$$

$$[2] \quad \log R2A20 = -8,86 \times RCT + 0,03 \times T + 3,89 \quad (r^2 = 0,72; n=292)$$

Ces modèles ont permis de prédire respectivement 63% et 72% des variations observées pour les dénombrements bactériens par épifluorescence et par culture sur gélose R2A. Les figures 5a et 5b montrent la correspondance entre les valeurs prédites par chacun des deux modèles et les valeurs observées sur l'ensemble des 5 sites du réseau et en sortie d'usine de traitement.

### 3) Variation de la consommation de CODB le long du réseau de distribution.

L'évolution de la concentration de CODB en sortie d'usine de potabilisation ainsi que la consommation moyenne de CODB le long du réseau (correspondant à la moyenne des consommations de CODB enregistrées sur les 5 sites pour une semaine donnée) ont été représentées sur la figure 6.



**Figure 6:** Variation des valeurs de CODB mesurées dans l'eau en sortie d'usine et consommations moyennes de CODB observées le long du réseau ou prédites (modèle [3]).

De fortes variations de CODB dans l'eau en sortie d'usine ont été observées d'une semaine à l'autre, avec des écarts pouvant atteindre 0,75 mg/l. Deux périodes dans l'évolution de la concentration de CODB en sortie d'usine ont été observées. Lorsque la température de l'eau était faible (inférieure à 15-17°C) (semaines 6 à 24 et 44 à 52 en 1991, semaines 1 à 5 en 1992), les valeurs de CODB en sortie d'usine ont été élevées, variant de 0,49 à 1,34 mg/l avec une moyenne de  $0,91 \pm 0,23$  mg/l. Par contre pour des températures de l'eau élevées (généralement supérieure à 15°C) (semaines 25 à 43 en 1991), les valeurs de CODB ont été plus faibles, variant de 0,37 à 1 mg/l avec une moyenne de  $0,74 \pm 0,25$  mg/l.

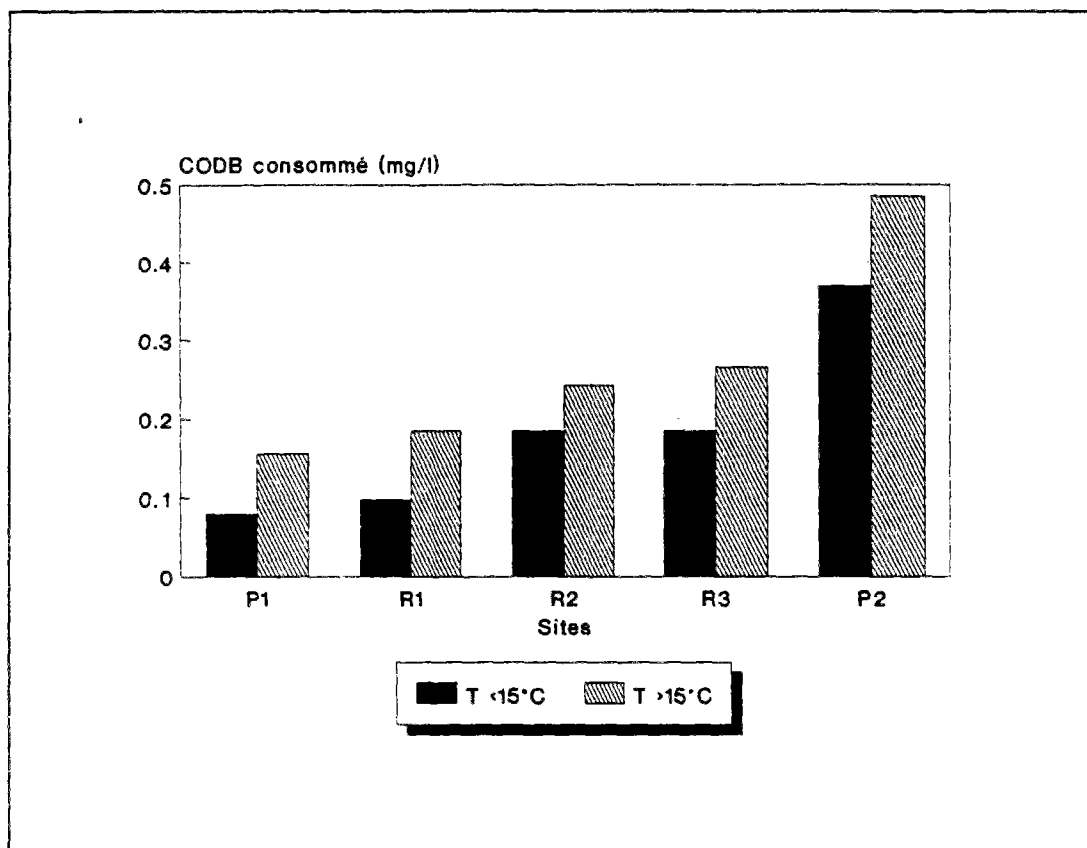
La consommation moyenne de CODB le long du réseau (Figure 6) a aussi présenté de fortes variations hebdomadaires. Les pics de consommation de CODB le long du réseau ont correspondu, dans la plupart des cas, à des pics de fortes valeurs de CODB en sortie d'usine. Toutefois, l'effet de la température de l'eau sur la consommation de CODB le long du réseau a semblé important. Cette consommation de CODB a augmenté avec l'augmentation de la température de 4 à 17°C (6<sup>e</sup> à la 24<sup>e</sup> semaine en 1991). Elle est restée importante sur le réseau de la 25<sup>e</sup> à la 43<sup>e</sup> semaine en 1991 (température généralement supérieure à 15°C), malgré des valeurs de CODB plus faibles en sortie d'usine. Ensuite elle a diminué progressivement à partir de la 45<sup>e</sup> semaine (1991) quand la température a décliné de 14°C à 5°C.

La consommation moyenne de CODB le long du réseau (CODB<sub>cons.</sub>, mg/l) a pu être prédite (modèle de régression linéaire multiple) à 54% à partir des valeurs de CODB en sortie d'usine (mg/l) et de la température de l'eau (T, °C) selon la formule [3]:

$$[3] \quad \text{CODB}_{\text{cons.}} = 0,38 \times \text{CODB}_{\text{usine}} + 0,013 \times T - 0,31 \quad (r^2 = 0,54; \quad n=49)$$

La figure 7 met clairement en évidence l'effet de la température de l'eau sur les moyennes des consommations de CODB enregistrées sur les différents sites de prélèvement. Les valeurs moyennes de consommation de CODB enregistrées sur les sites P1 et R1 proches de l'usine de traitement ont été de 0,08 et 0,10 mg/l (consommation de 8 et 10% du CODB en sortie

d'usine) pour des températures inférieures à 15°C et de 0,16 et 0,19 mg/l (18 et 22% du CODB usine) pour des températures supérieures à 15°C. Les valeurs moyennes de consommation de CODB enregistrées au niveau des réservoirs R2 et R3 étaient de 0,17 mg/l en période froide (17% du CODB usine) et ont atteint respectivement 0,24 mg/l et 0,27 mg/l en période chaude (soit 29 et 33% du CODB usine). Au niveau du site P2 le plus éloigné de l'usine de traitement, la valeur moyenne de consommation de CODB est passée de 0,36 mg/l (36% du CODB usine) en période froide, à 0,49 mg/l (64% du CODB usine) en période chaude.



**Figure 7:** Moyennes des valeurs de consommation de CODB sur les différents sites pour des températures de l'eau supérieures ou inférieures à 15°C.

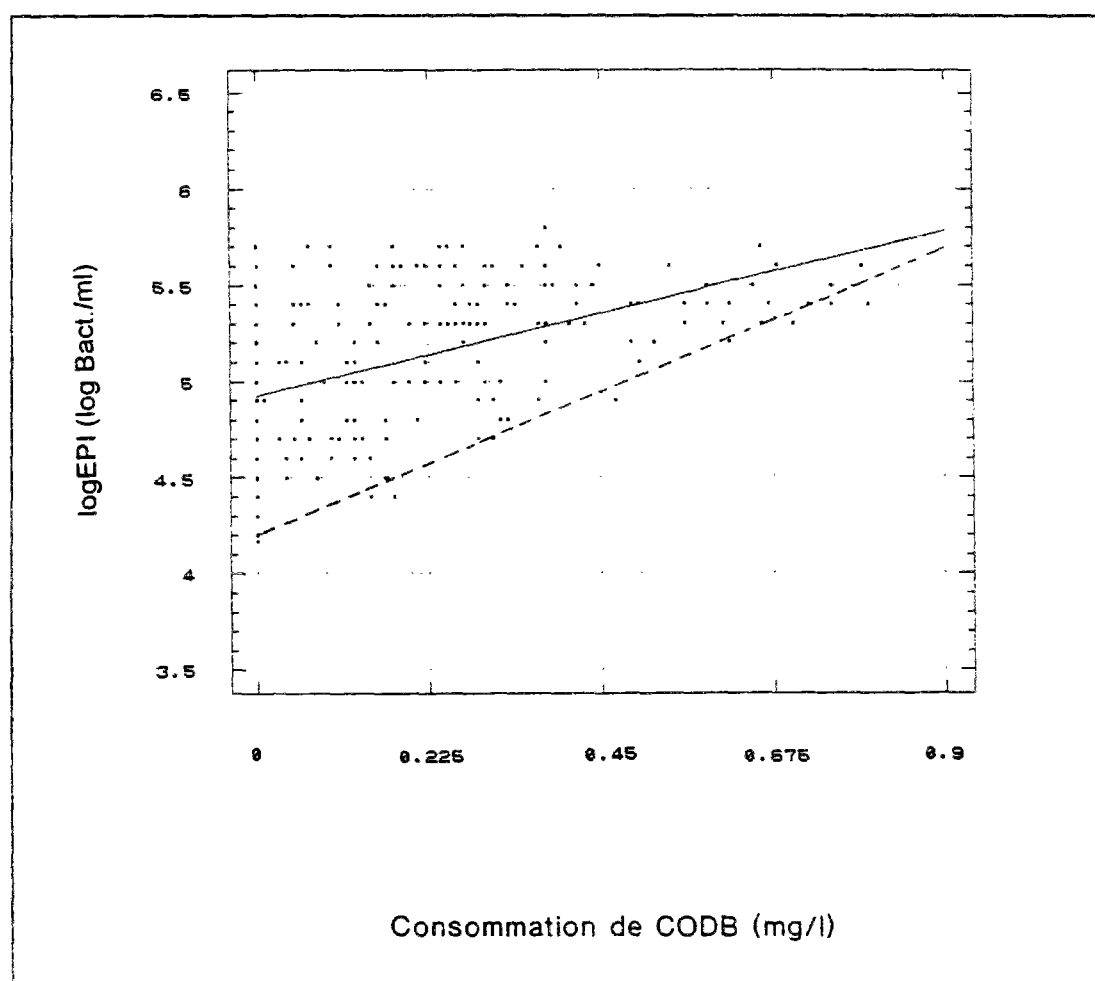
Les résultats présentés sur la figure 7 démontrent par ailleurs que le CODB a été consommé progressivement le long du réseau. La différence de CODB enregistrée entre l'usine de traitement et le site P2 a été quatre fois plus forte que celle enregistrée entre l'usine et le site



P1. De même, la moyenne des consommations de CODB par rapport à l'usine de traitement a été de 1,4 à 2 fois plus forte au niveau des réservoirs R2 et R3 qu' au niveau du réservoir R1.

Les figures 4 et 7 montrent que l'augmentation des valeurs de dénombrements bactériens le long du réseau de distribution s'est accompagnée d'une augmentation progressive de la consommation de matière organique biodégradable. Cependant la relation directe existant entre le logarithme des valeurs de dénombrements bactériens par épifluorescence (logEPI, Bact/ml) et la consommation de CODB ( CODB<sub>cons.</sub>, mg/l) correspondante enregistrée sur chacun des sites est médiocre (figure 8). La relation (régression linéaire simple) est la suivante :

$$[4] \quad \log EPI = 0,95 \text{ CODB}_{\text{cons.}} + 4,9 \quad (r^2 = 0,23; n=292)$$



**Figure 8:** Valeurs de dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence (logEPI) et consommation de CODB sur l'ensemble des sites étudiés.

— : régression linéaire simple

- - - : droite correspondant à la croissance minimale.

Cependant cette représentation graphique montre qu'il est possible d'associer la consommation de CODB ( $\text{CODB}_{\text{cons.}}$ , mg/l) à un seuil minimal de recroissance bactérienne ( $\text{LogEPI}_{\text{min}}$ , Bact./ml). L'équation de cette droite déterminée graphiquement et correspondant à la recroissance minimale est la suivante:

$$[5] \quad \text{logEPI}_{\text{min}} = 1,55 \text{ CODB}_{\text{cons.}} + 4,2$$

En l'absence d'une consommation de CODB, la contamination bactérienne minimale de l'eau a pu être estimée à  $1,6 \times 10^4$  Bact/ml. La consommation de CODB a conduit à une augmentation de la contamination bactérienne de l'eau.

## Discussion

Cette étude a montré les effets de la température et de l'absence de désinfectant sur la recroissance bactérienne le long d'un réseau de distribution. Cette recroissance bactérienne s'est accompagnée d'une consommation de CODB et dans certains cas de l'apparition de coliformes le long du réseau.

Nous avons distingué deux épisodes saisonniers dans l'observation des cas de coliformes: une période chaude (température de l'eau supérieure à  $15^{\circ}\text{C}$ ) et une période froide (température de l'eau inférieure à  $15^{\circ}\text{C}$ ) (Figure 2). Les coliformes sont apparus presque exclusivement quand la température de l'eau était supérieure à  $15^{\circ}\text{C}$  et sur des sites où les concentrations en chlore étaient faibles ou nulles (inférieures à 0,1 mg/l).

Le phénomène de recroissance des germes hétérotrophes a été observé sur le réseau quelle que soit la période de l'année (Figure 4). Il a été amplifié lorsque la température de l'eau était élevée et sur les sites éloignés de l'usine de traitement. Les variations de la qualité bactériologique de l'eau évaluée par dénombrement microscopiques en épifluorescence ( $\text{logEPI}$ ) ou par culture sur milieu R2A ( $\text{logR2A20}$ ) ont été prédites à 63% et 72% à partir de la température de l'eau et du résiduel de chlore total (formules [1] et [2]). La même observation a été faite sur un réseau

des Etats Unis par LeChevallier *et al.* (1990b, 1991) qui ont prédit à 80% les valeurs de dénombrements bactériens par culture sur milieu R2A. Au cours de notre étude, et pour une température de 20°C, l'inactivation des bactéries en suspension dénombrées par culture sur gélose R2A a été obtenue pour un résiduel de chlore de 0,51 mg/l. De même, sur un réseau expérimental (Nancy, France) dont la valeur moyenne de CODB était de 0,45 mg/l, une valeur identique de résiduel de chlore a été nécessaire pour inactiver les germes en suspension cultivables sur milieu gélosé. Par contre, sur un réseau dont la teneur en matière organique était beaucoup plus forte (concentration moyenne en carbone organique assimilable de 214 µg C eq. acétate /l et correspondant à environ 2 mg/l de CODB (Volk *et al.* 1992)), une concentration en résiduel de chlore de 1,93 mg/l a été nécessaire pour atteindre ce même objectif (Le Chevallier *et al.* 1990b, 1991). Cette différence dans les concentrations en chlore résiduel observée entre le réseau situé aux Etats Unis et celui de Méry sur Oise peut être en partie, liée à une différence du niveau de matière organique biodégradable dans ces deux réseaux.

Lorsque la concentration des germes cultivables sur milieu gélosé est nulle, la valeur des dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence a été de  $4,9 \times 10^4$  Bact./ml lors de notre étude, et seulement de  $3 \times 10^2$  Bact./ml dans le réseau expérimental de Nancy (Mathieu *et al.* 1992). Ceci est sans doute à relier à la contamination bactérienne en provenance de l'usine de traitement qui est supérieure à  $10^4$  Bact./ml en sortie de l'usine de Méry sur Oise et de  $1,6 \times 10^3$  Bact./ml à l'entrée du réseau expérimental.

Le suivi de la teneur en CODB dans l'eau en sortie d'usine de potabilisation et de son évolution le long du réseau a donné lieu à plusieurs observations. Malgré de fortes variations hebdomadaires des concentrations en matière organique biodégradable dans l'eau produite en sortie d'usine, deux tendances ont été observées (Figure 6). Les valeurs de CODB ont été en moyenne plus fortes en hiver, au début du printemps et à la fin de l'automne (semaines 6 à 24 et 44 à 52 en 1991, semaines 1 à 5 en 1992), quand la température de l'eau était faible (inférieure à 15 - 17°C), et donc plus faibles en été et au début de l'automne (semaines 24 à 43 en 1991) pour des températures élevées (température de l'eau généralement supérieure à

15°C). Ce phénomène peut être le fait d'un lessivage important de la matière organique des sols par les précipitations abondantes, d'une réduction de l'activité biologique dans le milieu naturel et d'une efficacité réduite des filières de traitement biologique en période froide. Cependant, une tendance inverse a été observée dans l'eau distribuée à Metz (France). Les valeurs de COD et de CODB étaient plus faibles lors de la période hivernale (Mathieu *et al.* 1991).

La consommation de matière organique biodégradable a augmenté au cours du transit de l'eau le long du réseau de distribution. Ce phénomène a été mentionné par plusieurs auteurs (Le Chevallier *et al.* 1991; Mathieu *et al.* 1991; Prévost *et al.* 1991; Cappelier *et al.* 1992). De même, la consommation de CODB a été plus marquée sur des canalisations de faibles diamètres situées aux extrémités d'un ancien réseau de distribution (Servais *et al.* 1992).

Comme l'ont observé Mathieu *et al.* (1991) (dans un réseau expérimental) et Prévost *et al.* (1991) (dans un réseau du Canada), lors de notre étude la consommation de CODB enregistrée le long du réseau de distribution de Méry sur Oise a augmenté avec la température. Les valeurs moyennes de consommation de CODB enregistrée sur chaque site ont été 1,4 à 2 fois plus fortes lorsque les températures de l'eau étaient supérieures à 15°C.

Sur des petites canalisations, Servais *et al.* (1992) ont montré que la consommation de CODB était directement reliée à la valeur de CODB de l'eau en sortie d'usine. Au cours de notre étude, et pour l'ensemble des sites, la consommation moyenne de CODB le long du réseau (assimilée à la moyenne des consommations de CODB enregistrées sur les différents sites pour une semaine donnée) a été prédite à partir de deux paramètres, la température et la teneur en CODB dans l'eau en sortie d'usine (relation [3]). La stabilité biologique correspondant à une consommation de CODB nulle sur le réseau serait obtenue pour une valeur de CODB en sortie d'usine de 0,15 mg/l à une température de 20°C et de 0,30 mg/l à une température de 15°C. De même, Servais *et al.* (1992) ont estimé à 0,16 mg/l la valeur de CODB en sortie d'usine de traitement correspondant à la stabilité biologique. Ce résultat concorde avec le notre, les valeurs de CODB mesurées avec un inoculum bactérien fixé étant 2 fois plus fortes que celles

déterminées avec des bactéries en suspension (Volk *et al.* 1993). Comme Block *et al.* (1993b) recommandant une teneur en CODB nulle dans les eaux de distribution et Van der Kooij (1992) qui préconise des concentrations de carbone organique assimilable inférieures à 10 µg C eq. acétate/l, l'ensemble des résultats montrent que la maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau n'est possible que pour des teneurs en matière organique biodégradable très faibles dans l'eau en sortie de l'usine de potabilisation. Cet objectif est difficile à atteindre même avec des filières biologiques. Dans une autre étude, nous avons montré que l'apparition des coliformes sur le réseau de distribution a été associée à une consommation de CODB supérieure à 0,15 mg/l (Volk et Joret 1993). La limitation de l'apparition de coliformes impliquerait donc une teneur en CODB en sortie d'usine inférieure à 0,55 mg/l pour une température de 20°C et à 0,70 mg/l pour une température de 15°C. Ces valeurs sont concordantes avec les résultats de LeChevallier *et al.* (1991) qui a préconisé une concentration en COA inférieure à 50 µg C eq. acétate/l pour limiter les observations de coliformes sur le réseau.

Nous avons pu établir une relation directe entre la consommation de CODB et le niveau minimum de contamination bactérienne de l'eau (Figure 8). En l'absence d'une consommation de CODB, la contamination bactérienne minimale de l'eau au cours de cette étude a été estimée à  $1,6 \times 10^4$  Bact./ml. Cette concentration semble varier beaucoup d'un réseau à un autre. Elle a été estimée à  $2,9 \times 10^5$  Bact./ml sur un réseau expérimental (Mathieu *et al.* 1992) mais à seulement  $8 \times 10^2$  -  $6 \times 10^4$  Bact./ml sur un réseau alimenté par une eau sans matière organique biodégradable dosable (Levi *et al.* 1992). Une consommation de CODB de 0,10 mg/l s'est traduit par une accumulation bactérienne supplémentaire de  $7 \times 10^3$  Bact./ml sur le réseau de Méry sur Oise, valeur 5 fois plus faible que celle rapportée antérieurement par Mathieu *et al.* (1992). L'hétérogénéité de ces résultats pourrait résulter de différences dans la mise en oeuvre de la mesure du CODB. Elle traduit par ailleurs le fait que la mesure du CODB reste une mesure globale de la matière organique biodégradable et ne donne pas d'indication sur la fraction réellement utilisable par les bactéries au cours du transit de l'eau dans les réseaux de distribution.

Le phénomène de recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution répond à une logique dont les 3 paramètres clés sont la teneur en matière organique biodégradable dans l'eau en sortie de l'usine de traitement, la température et le résiduel de chlore. La maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau demande une limitation drastique du niveau de matière organique biodégradable en sortie d'ouvrage de traitement (paramètre difficilement maîtrisable à l'heure actuelle avec les filières de traitement classiques) ou, à défaut, le maintien d'un résiduel de chlore efficace sur l'ensemble du réseau.

## Références

AFNOR NFT 90 401. Essais des eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par filtration sur membrane. Oct. 1985 (AFNOR, Paris).

Allen, M.J., Taylor, R.H., et Geldreich, E.E. 1980. The occurrence of microorganisms in water main encrustations. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **72**: 614-625.

Block, J.C., Haudidier, K., Paquin, J.L., Miazga, J., et Levi Y. 1993a. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling*. **6**: 333-343.

Block, J.C., Servais, P. et Werner, P. 1993b. Proc. Technology conference on bacterial regrowth "Bugs molecules and surfaces. Big Sky, Montana (27-28 août 1993).

Bourbigot, M.M., Dodin, A., et Leritier, R. 1984. La flore bactérienne dans un réseau de distribution. *Wat. Res.* **18**: 585-591.

Bouwer, E.J., et Crowe, P.B. 1988. Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **80**: 82-92.

Bryers, J.D. 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistance of biofilm. *Biotechnol. Progress*. **3**: 57-68.

Bryers, J.D., et Characklis, W.G. 1982. Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnol. Bioengg.* **24**: 2451-2476.

Camper, A.K., Goldstein, B., Szego, S., Peyton, B., Drury, W., Mueller, R., Zilver, N. et Characklis, W.G. 1991a. Ecophysiologie des biofilms microbiens dans les réseaux de distribution d'eau. *T.S.M. l'Eau.* **9**: 428.

Camper, A.K., Mc Feters, G.A., Characklis, W.G., et Jones, W.L. 1991b. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Appl. Envir. Microbiol.* **57**: 2233-2239.

Capellier, M., Picoche, C., et Deguin, A. 1992. Devenir du CODB dans le réseau de distribution: étude de deux cas. *Sci. Eau* **5**: 51-67.

Coallier, J., Lafrance, P., Duchesne, D., et Lavoie, J. 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable. *Sci. Tech. Eau.* **22**: 63-72.

Donlan, R.M, et Pipes W.O. 1988. Selected drinking water characteristics and microbial population density. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **80**: 70-76.

Geldreich, E.E., et Rice, E.W. 1987. Occurrence, significance and detection of *Klebsiella* in water systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **79**: 74-80.

Goshko, M.A., Pipes, W.O., et Christian, R.R 1983. Coliforms occurrence and chlorine residual in small water distribution systems. *J. Am. Wat. Works Ass.* **75**: 371-374.

Haudidier, K., Paquin, J.L., Francais, T., Hartemann, P., Grapin, G., Colin, F., Jourdain, M.J., Block, J.C., Cheron, J., Pascal, O., Levi, Y. et Miazga, J. 1988. Biofilm growth in drinking water network: a preliminary industrial pilot plant experiment. *Water Sci. Technol.* **20**: 109-115.

Huck, P.M. 1990. Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth in drinking water. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **82** :78-86.

Joret, J.C., et Levi, Y. 1986. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib.Cebedeau* **39** :3-9.

Joret, J.C. et Volk, C. 1993. Mesure de la matière organique dans les eaux: méthodologies et applications. TSM, l'Eau. Soumis pour publication.

LeChevallier, M.W. 1990. Coliform regrowth in drinking water: a review. J. Am. Wat. Works. Ass. **82** : 74-86.

LeChevallier, M.W., Babcock, T.M., et Lee, R.G. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. Appl. Envir. Microbiol. **53**: 2714-2724.

LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., et Lee, R.G. 1988. Inactivation of biofilm bacteria. Appl. Envir. Microbiol. **54**: 2492-2499.

LeChevallier, M.W., Lowry, C.D., et Lee R.G. 1990a. Disinfecting biofilms in a model distribution system. J. Am. Wat. Works. Ass. **82** : 87-99.

LeChevallier, M.W., Olson, B.H. et Mc Feters G.A. editors, 1990b. Assessing and controlling bacterial regrowth in distribution systems. AWWARF, Denver, COL.

LeChevallier, M.W., Shulz, W., et Lee R.G. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. Appl. Envir. Microbiol. **57**: 857-862.

Levi, Y., Randon, G., Denojean, C., Pagliardini, A., Vajente, G., et Champsaur, H. 1992. Etude d'un réseau à faible teneur en matière organique biodégradable: le réseau de la ville de Nice. Sci. Eau **5**: 225-243.

Levy, R.V., Hart, F.L., et Cheetham, R.D. 1986. Occurrences and public health significance of invertebrates in drinking water systems. J. Am. Wat. Works. Ass. **78**: 105-110.

Martin, R.S., Gate, W.H., Tobin, R.S., Grantham, D., Sumarah, R., Wolfe, P. et Forestall, P. 1982. Factors affecting coliform bacteria growth in distribution systems. J. Am. Wat. Works Ass. **74**: 34-37.

Mathieu, L., Block, J.C., Florentz, M. et Trepagne, P., 1991. Devenir de la matière organique biodégradable dans un réseau de distribution d'eau. T.S.M., l'Eau. **9**: 437.



Mathieu, L., Paquin J.L., Block, J.C., Randon, G., Maillard, J., et Reasoner D. 1992. Paramètres controlant la prolifération des bactéries dans les réseaux de distribution. *Sci. Eau* **5**: 91-112.

Payment, P., Gamache, F., et Paquette, G. 1988. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1304-1309.

Prevost, M., Desjardin, R., Duchesne, D., et Coallier, J. 1991. L'effet de la demande en chlore et de l'enlèvement du carbone organique dissous biodégradable (CODB) sur la recroissance bactérienne. *T.S.M, l'Eau*. **9**: 436.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. (Eaux naturelles - Eaux résiduares - Eaux de mer). 7th ed.; DUNOS ed.

Servais, P., Billen, G., and Hascoet, M.C. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Wat. Res.* **21**: 445-450.

Servais, P., Billen, G., Laurent, P., Levi, Y., et Randon, G. 1992. Etude de la dynamique du CODB et des bactéries dans un réseau de distribution de la banlieue Nord de Paris. *Sci. Eau* **5**: 69-89.

Servais, P., Billen, G., Laurent, P., Levi, Y., et Randon, G. 1993. Bacterial in distribution systems. *Proc. AWWA WQTC conf., Miami, FL (7-10 Novembre)*.

Thurman, E.M., et Malcolm, R.L. 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 463-466.

Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **84**: 57-65.

Van der Kooij, D., Visser, A. et Hijnen, W.A.M. 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **74**: 540-545.

Van der Wende, E., Characklis, W.G. et Smith, D.B. 1989. Biofilm and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* **23**: 1313-1322.

Ventresque, C., et Bablon, G. 1989. Ozone, a mean of simulating activated carbon reactors. *Proc. 9th Ozone World Congress IOA, New York*.

Volk, C., et Joret, J.C. 1993. Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes sur les réseaux de distribution. *Sci. Eau*. Soumis pour publication.

Volk, C., Renner, C., et Joret, J.C. 1992. La mesure du CODB: un index du potentiel de reviviscence bactérienne des eaux. *Sci. Eau* 5: 189-206.

Volk, C., Renner, C., Robert, C. and Joret J.C., 1993. Comparison of two techniques for measuring biodegradable dissolved organic carbon in water. *Env. Technol.* soumis pour publication.



# **PARAMETRES PREDICTIFS DE L'APPARITION DES COLIFORMES DANS LES RESEAUX DE DISTRIBUTION D'EAU D'ALIMENTATION.**

**Christian Volk et Jean Claude Joret.**

ANJOU RECHERCHE, Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux.

Chemin de la digue, BP 76. 78600 Maisons - Laffitte. France.

Tel: 33 1 39 62 34 56

Fax: 33 1 39 62 70 75

**Soumis à *Revue des Sciences de l'Eau* (Septembre 1993)**

## Summary

Coliform occurrences in drinking water in the absence of known breaches of treatment barriers are still a problem in the drinking water industry. The purpose of this study was to define threshold values for different bacteriological, chemical and physical parameters, beyond which coliforms occurred more frequently along a full scale distribution system in a northern suburb of Paris. A predictive model of coliform occurrence on the sites of a distribution network was produced (AL COL model).

This study consisted of two stages. The first one involved following coliform occurrences, epifluorescent counts, temperature, biodegradable dissolved organic carbon, and residual chlorine level in the treatment plant effluent and on five distribution sampling sites. Each site was sampled once a week for one year ( $n=47$ ; February 1991 - February 1992). This first stage of study showed that the occurrence of coliforms in the network could be associated with temperatures greater than a threshold value of  $15^{\circ}\text{C}$ , a BDOC consumption greater than  $0.15\text{ mg/l}$ , a logarithm of the epifluorescent counts higher than 5.2 and a residual chlorine lower than  $0.10\text{ mg/l}$ . Graduation of coliform occurrences was possible by the combination of overstepped thresholds for these four parameters. Three levels of risk associated with an increasing frequency of coliform occurrence were defined: site with no risk when no or only one threshold value was exceeded, slightly exposed site when 2 or 3 threshold values were exceeded and exposed site when 4 threshold values were exceeded.

The second stage of the study concerned the application of this predictive model. It consisted of following weekly the same parameters as in the first stage on 7 and 10 distribution sites situated on 2 different distribution systems (Northern and Eastern suburb of Paris) for 21 weeks (April - September 1992). The threshold values determined were similar on the two distribution systems. They were  $15^{\circ}\text{C}$  for temperature;  $0.10 - 0.15\text{ mg/l}$  for BDOC consumption, 5 - 5.2 for the

logarithm of epifluorescent counts and 0.10 mg/l for residual chlorine. The frequency of coliform occurrences was about 60% on sampling points assessed as exposed sites, 5% on sampling points assessed as slightly exposed sites and 1% on sites considered with no risk.

Moreover, it was possible to define a model of mean risk of coliform occurrences on the whole sites (corresponding to the mean of overstepped thresholds on the different studied sites for a given week). Four levels of mean risk (minimum, non negligible, critical, and maximum) were associated with increasing frequencies of coliform observations on the network.

The AL COL model could be an efficient and simple tool to control and limit occurrences of coliforms in drinking water. When a site is assessed as exposed, disinfection treatments have to be performed in order to reduce this risk and to prevent coliform occurrences during the weeks following this risk. Moreover, it was also possible to define a chlorine level in the water to reduce the bacterial contamination and subsequently decrease the risk of coliform occurrences on the sites of the network.

### **Key words**

Bacterial regrowth - Distribution system - Coliform - Epifluorescent count - Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) consumption - Residual chlorine - Temperature - Predictive model.

### **Résumé**

L'isolement sporadique de coliformes sur certains réseaux de distribution en période chaude et en absence de tout épisode décelable de contamination (défaut de traitement, post-contamination)

laisse supposer que la présence de ces germes dans l'eau pourrait être associée à la présence d'un biofilm important à la surface des canalisations.

Cette hypothèse a pu être vérifiée lors de cette étude réalisée sur différents réseaux de la banlieue parisienne.

Ce travail a mis en évidence une relation entre la fréquence d'observation des coliformes sur les sites du réseau et le dépassement de seuils critiques pour quatre paramètres:

- le niveau de salissure bactériologique de l'eau évalué par le dénombrement de la flore bactérienne planctonique totale par microscopie en épifluorescence,
- la température,
- la consommation de matière organique biodégradable (CODB),
- la concentration en chlore libre résiduel.

Le degré d'exposition des sites d'un réseau de distribution a pu être estimé par comptabilisation des dépassements des seuils critiques pour ces quatre paramètres. Trois niveaux de risques croissants (sans risque, faiblement exposé et exposé) ont été établis correspondant à des fréquences de plus en plus importantes d'apparition des coliformes sur les sites du réseau de distribution.

Pour une semaine donnée, le calcul de la moyenne des dépassements simultanés des seuils critiques enregistrés sur l'ensemble des sites a permis de définir quatre niveaux de risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites (minimum, non négligeable, critique et maximum) en relation avec des observations de coliformes de plus en plus fréquentes sur le réseau.

Il a aussi été possible de définir un taux de chlore à appliquer sur un site afin de diminuer le niveau de contamination bactérienne de l'eau et par conséquent réduire le risque d'apparition des coliformes sur ce site.

## Mots clés

Reviviscence bactérienne - Réseau de distribution - Coliformes - Dénombrements bactériens microscopiques en épifluorescence - Consommation de carbone organique dissous biodégradable (CODB) - Concentration en chlore résiduel - Température - Modèle d'alerte.

## Introduction

La multiplication des micro-organismes le long d'un réseau de distribution (ou reviviscence bactérienne) entraîne la détérioration de la qualité bactériologique de l'eau, l'apparition de mauvais goûts, d'odeurs ou de couleur, et l'accélération du phénomène de corrosion des canalisations (ALLEN *et al.*, 1980; BOWER et CROWE, 1988; COALLIER *et al.*, 1989). La dégradation de la qualité bactériologique des eaux se manifeste le plus souvent par des augmentations de la flore aérobie mésophile (*Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*...)(BOURBIGOT *et al.*, 1984; LeCHEVALLIER *et al.*, 1987; PAYMENT *et al.*, 1988) et parfois par l'apparition de coliformes (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*...) (GOSHKO *et al.*, 1983; GELDREICH et RICE, 1987; EDBERG et SMITH, 1989; LeCHEVALLIER, 1990; CAMPER *et al.*, 1991b). Dans le cas de la flore aérobie mésophile banale, il est aujourd'hui établi que dans la plupart des cas, la dégradation de la qualité bactériologique de l'eau résulte du décrochement de bactéries du biofilm établi à la surface des canalisations ou sur des matières en suspension (Van der WENDE *et al.*, 1989). L'accumulation de micro-organismes dans ce biofilm est gouvernée par des processus de dépôt de bactéries en suspension dans l'eau, de métabolisme et de détachement des bactéries fixées sous l'action des forces de friction de l'eau (BRYERS, 1987; DONLAN et PIPES, 1988; HAUDIDIER *et al.*, 1988; MATHIEU *et al.*, 1992; BLOCK *et al.*, 1993). L'isolement sporadique de coliformes en période chaude et en l'absence de tout épisode décelable de contamination (défaut de traitement, post - contamination) laisse supposer que ces germes sont capables de survivre dans les réseaux



de distribution et de se multiplier au sein du biofilm (LeCHEVALLIER *et al.*, 1987; LeCHEVALLIER, 1990). Les observations de coliformes sont en effet généralement associées à des fortes valeurs de germes appartenant à la flore aérobie mésophile (germes revivifiables sur gélose) et à l'absence ou à de faibles valeurs de désinfectants résiduels tels que le chlore. L'apparition des coliformes serait aussi en liées à la température de l'eau distribuée (supérieure à 15°C), sa teneur en matière organique biodégradable et les précipitations affectant la qualité de l'eau brute avant traitement (LeCHEVALLIER *et al.*, 1990, 1991; CAMPER *et al.*, 1991a). Cependant il est très difficile de prédire de manière simple et avec précision, à partir de modèles de régression linéaire simple ou multiple, ces épisodes d'apparition des coliformes avec un ou plusieurs paramètres physicochimiques ou bactériologiques (EDBERG et SMITH, 1989; LeCHEVALLIER *et al.*, 1990). Ce travail a donc été réalisé afin de mieux comprendre et prévoir les épisodes d'apparition de coliformes le long des réseaux de distribution.

Notre étude avait deux buts:

- sélectionner, pour un ensemble de paramètres d'appréciation de la qualité de l'eau (i.e. un paramètre bactériologique (dénombrements microscopiques en épifluorescence) et trois paramètres physico-chimiques: la température (traduisant l'effet des saisons), le chlore résiduel (effet de la présence d'un toxique), et la teneur en carbone organique dissous biodégradable (influence de la matière organique)), un seuil critique dont le dépassement était le plus fréquemment associé à l'observation des coliformes sur le réseau de distribution.
- élaborer, à partir des valeurs seuils ainsi déterminées et selon une démarche originale, un modèle prédictif du risque d'apparition des coliformes (nommé modèle AL.COL) sur différents sites du réseau de distribution afin d'adopter des mesures préventives adaptées.

Ce travail a comporté 2 phases distinctes (Tableau 1). La phase préliminaire de l'étude a consisté à suivre en parallèle pendant 47 semaines (Février 1991 - Février 1992) l'apparition des coliformes, un autre paramètre de l'évolution de la qualité microbiologique de l'eau (dénombrements

microscopiques en épifluorescence) et, certains paramètres physico-chimiques (température, chlore résiduel, et carbone organique dissous biodégradable) sur un réseau de distribution. Ce suivi a été réalisé sur l'eau en sortie d'usine de Méry sur Oise et sur 5 sites du réseau de distribution alimenté par cet ouvrage. Cette première phase a conduit à l'élaboration d'un premier modèle prédictif.

La seconde phase d'étude a porté sur la mise en application de ce modèle prédictif par le suivi de 2 réseaux de distribution pendant 21 semaines lors de la période chaude (Avril - Septembre 1992).

**Tableau 1:** Récapitulatif des expérimentations réalisées lors des deux phases d'études.

*Table 1: Summary of experiments during the two stages of the study.*

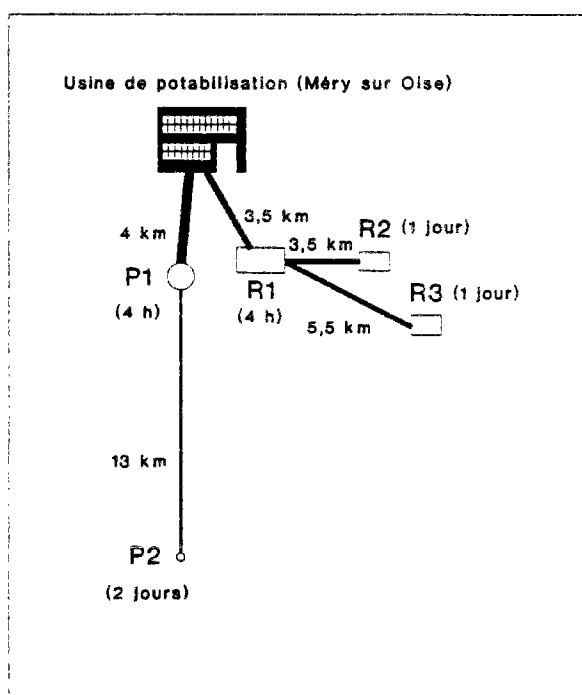
|                                 | <b>Première phase d'étude</b><br>(Février 1991 - Février 1992) | <b>Seconde phase d'étude</b><br>(Avril- Septembre 1992) |          |
|---------------------------------|--|---|----------|
| Réseau étudié                   | Réseau 1   | Réseau 1  | Réseau 2 |
| Nombre de semaines d'études     | 47   | 21  | 21       |
| Nombre de points de prélèvement | 5  | 7   | 10       |

## **Matériels et méthodes.**

### **1) Réseaux de distribution étudiés.**

La phase préliminaire de l'étude (Février 1991 - Février 1992) (Tableau 1) a porté sur le contrôle de l'eau en sortie de l'usine de potabilisation de Méry sur Oise dont les caractéristiques ont été précédemment décrites (VENTRESQUE et BABLON, 1989) et sur 5 points du réseau de distribution (Réseau 1) alimenté par cet ouvrage (Figure 1):

- le site P1 est situé à 4 km de l'usine de traitement. Le point de prélèvement est localisé sur une canalisation principale ( diamètre de 1 m). Le temps de séjour de l'eau dans le réseau à ce point a pu être estimé à quelques heures.
- le point de prélèvement P2 est situé à 17 km de l'usine, à l'extrémité du réseau, sur une canalisation de faible diamètre ( 0,2 m). Pour ce site, le temps de séjour de l'eau est de 1-2 jours.
- le site R1 est un réservoir (12 000 m<sup>3</sup>) situé à 3,5 km de l'usine (temps de séjour de l'eau de quelques heures). L'eau est ensuite répartie dans deux autres réservoirs (R2: 700 m<sup>3</sup>, R3: 5000 m<sup>3</sup>) situés respectivement à 7 et à 9 km de l'ouvrage de traitement. Pour ces 2 sites, le temps de séjour de l'eau dans le réseau est d'environ 1 jour.



**Figure 1:** Représentation schématique des 5 sites du réseau de distribution 1.

(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

*Figure 1: Schematic map of studied sites on distribution system 1.*

(Stage of study: February 1991 - February 1992)

Les paramètres bactériologiques (dénombrement microscopique en épifluorescence, dénombrement des coliformes) et physico-chimiques (température, résiduel de chlore, Carbone Organique Dissous Biodégradable) ont été contrôlés dans l'eau en sortie d'usine et sur les 5 sites chaque semaine (n=47) des mois de février 1991 à février 1992. Afin de respecter le temps de résidence de l'eau, l'échantillonnage a été réalisé avec un décalage de 4 heures par rapport à l'usine de traitement pour les sites P1 et R1, 1 jour pour les réservoirs R2 et R3, et 2 jours pour le site P2.

Les échantillons d'eaux destinés aux analyses bactériologiques ont été collectés dans des flacons stériles de 500 ml contenant 10 mg de thiosulfate de sodium. Les dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence ont été réalisés à partir d'une prise d'échantillon de 50 ml fixée par du formaldéhyde (concentration finale 2%) et stockée à 4 °C jusqu'à l'analyse. Le prélèvement des échantillons destinés à la mesure du carbone organique dissous biodégradable a été effectué dans des flacons en verre brun de 500 ml traités à 550°C pendant quatre heures pour éviter toute contamination carbonée des échantillons.

Les mêmes paramètres bactériologiques et physico-chimiques ont été contrôlés lors de la deuxième phase d'étude (Tableau 1). Deux réseaux de distribution de la région parisienne desservis par les usines de Méry sur Oise (réseau 1), et de Neuilly sur Marne (réseau 2) ont été contrôlés chaque semaine pendant 21 semaines (Avril - Septembre 1992). Le suivi a porté sur 7 sites sur le réseau 1, et 10 sites sur le réseau 2. Ces sites étaient répartis sur l'ensemble de chaque réseau de distribution et alimentés exclusivement par chacune des usines de potabilisation.

## **2) Paramètres bactériologiques.**

### **a) Dénombrement microscopique en épifluorescence. (EPI)**

Chaque échantillon d'eau (3 - 10 ml) a été filtré au travers d'une membrane en polycarbonate noire (Millipore, porosité = 0,2 µm, diamètre = 25 mm). Les bactéries retenues sur la membrane ont été

colorées pendant 10 min. avec 2 ml d'une solution d'orangé d'acridine à 30 µg / ml (Merk ref. 1333). Les dénombrements ont été réalisés par observation de 20 champs microscopiques (microscope Leitz, dialux 20, grossissement 630x) sous excitation UV (Orsam, HBO 50W). Les résultats sont exprimés en bactéries par ml (Bact./ml)

#### **b) Dénombrement des coliformes.**

Les coliformes ont été dénombrés selon la méthode AFNOR NFT 90 414 par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm (Sartorius, nitrate de cellulose, diamètre = 50 mm). Les membranes ont été incubées sur milieu TTC tergitol (Inst. Pasteur, ref. 64457), à 37°C pendant 48 h (coliformes totaux) et à 44°C pendant 24 h (coliformes thermotolérants). Tous les coliformes présumés apparaissant à 37°C ont été confirmés par le test oxydase. Les résultats sont exprimés en Unités Formant Colonie (UFC)/100 ml.

#### **3) Mesure du carbone organique dissous biodégradable (CODB) et calcul de la consommation de CODB entre l'usine de traitement et un site de prélèvement.**

Le CODB a été mesuré au laboratoire par incubation des échantillons d'eau avec un inoculum de bactéries fixées sur du sable selon la méthode décrite par JORET et LEVI (1986). La consommation de CODB enregistrée entre l'usine de traitement et chaque site de prélèvement (CODB<sub>cons.</sub>) a été obtenue par différence entre la valeur de CODB enregistrée dans l'eau refoulée par l'usine de traitement et celles mesurées sur chacun de ces sites.

#### **4) Paramètres physico-chimiques.**

- la température de l'eau (°C) a été mesurée en continu à la sortie de l'usine de traitement et manuellement sur chaque site de prélèvement.
- le résiduel de chlore a été analysé au moment du prélèvement par la méthode à la diéthyl - paraphénylène - diamine (DPD) (RODIER, 1984). Lors de la première phase d'étude, seul le

résiduel de chlore total (RCT) a été mesuré. Au cours de la deuxième phase d'étude, les résiduels de chlore libre (RCL) et total ont été contrôlés.

## **Résultats et discussion**

Les résultats ont été présentés en trois parties. La première a été consacrée au détail de l'élaboration du modèle de risque d'apparition des coliformes sur le réseau 1 réalisée lors de la première phase d'étude (février 1991 - février 1992). La représentation du nombre de coliformes apparus sur l'ensemble des sites contrôlés en fonction des différents paramètres étudiés a permis de définir une valeur seuil pour laquelle la fréquence d'apparition des coliformes était élevée lorsque ce seuil critique était dépassé. Le modèle de risque d'apparition des coliformes sur sites a ensuite été élaboré. Son principe repose sur le fait que la combinaison de valeurs seuils dépassées simultanément (pour les 4 paramètres) est associée à des fréquences plus fortes d'observation des coliformes, trois niveaux de risque d'apparition des coliformes ont alors été définis. Dans la seconde partie du travail, le modèle a été mis en application sur deux réseaux de distribution (avril - septembre 1992): le réseau 1 (qui a fait l'objet de l'élaboration du modèle précédemment décrit) et le réseau 2 après calage des différentes valeurs seuils pour ce dernier. Dans la troisième partie, nous avons défini un modèle de risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites du réseau. Il a été basé sur le calcul de la moyenne des dépassements de valeurs seuils enregistrées sur les différents sites pour une semaine donnée.

### **A) ELABORATION DU MODELE "ALERTE COLIFORMES" (AL COL): Détermination du risque d'apparition des coliformes sur un site donné (première phase d'étude: février 1991 - février 1992).**

Les différents paramètres de qualité de l'eau ont été contrôlés chaque semaines pendant un an dans l'eau en sortie d'usine de traitement. A titre d'information, les caractéristiques moyennes de l'eau produite ont été données dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Caractéristiques moyennes de l'eau produite en sortie d'usine de traitement de Méry sur Oise (n=50)  
(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

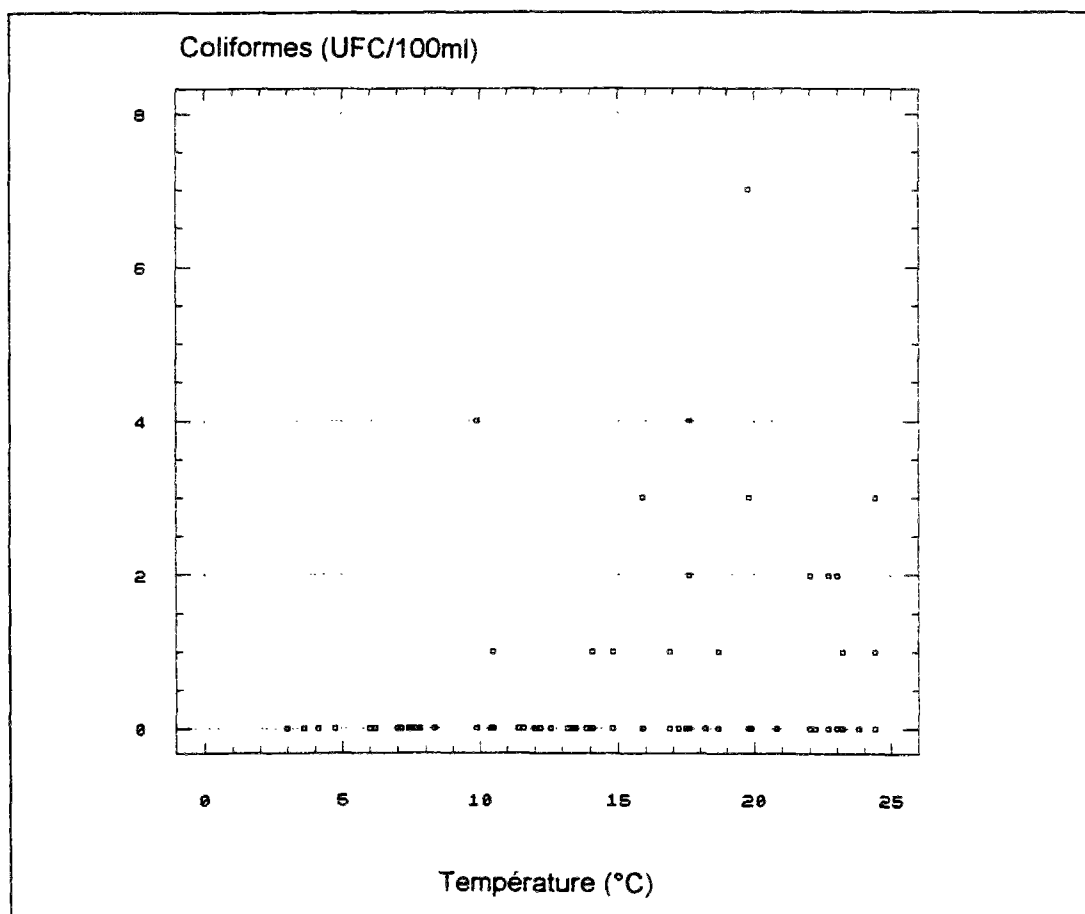
*Table 2: Mean characteristics of Méry sur Oise treatment plant effluent (n=50).  
(Stage of study: February 1991 - February 1992)*

|   | Moyenne<br>( $\sigma$ ) | Minimum | Maximum |
|---|-------------------------|---------|---------|
| COD<br>(mg/l)   | 2,55<br>(0,35)          | 1,99    | 3,66    |
| CODB<br>(mg/l)  | 0,86<br>(0,25)          | 0,37    | 1,34    |
| Résiduel de chlore total<br>(mg/l)  | 0,42<br>(0,04)          | 0,32    | 0,55    |
| Turbidité<br>(NTU)  | 0,16<br>(0,04)          | 0,10    | 0,25    |
| Dénombrement des bactéries par<br>microscopie en épifluorescence<br>( $\times 10^4$ Bact./ml) | 5,3<br>(2,4)            | 1,5     | 13      |
| Dénombrement des germes cultivables<br>sur milieu R2A (incubé 11 j. à 20°C)<br>(UFC/ml)       | 5<br>(13)               | 0       | 70      |
| Dénombrement des coliformes totaux<br>(UFC/100ml)   | 0                       | 0       | 0       |

Sur les figures 2, 3, 4 et 5 ont été reportés les nombres de coliformes (coliformes totaux) isolés sur les différents points de prélèvement en fonction de la température, de la valeur des dénombrements bactériens par microscopie en épifluorescence, de la consommation de CODB, et

de la concentration en résiduel de chlore total enregistrées sur les sites. L'analyse des résultats démontre qu'il n'y a pas de relation directe (de type linéaire) entre le nombre de coliformes apparus et les valeurs enregistrées pour chaque paramètre étudié. Cependant il existe pour chacun de ces paramètres une valeur dite seuil dont le dépassement correspond à l'observation très fréquente de coliformes, et qui peut être déterminée graphiquement. Les exemples présentés sur les figures 2, 3, 4 et 5 démontrent que:

- 76% des cas d'apparition de coliformes sont associés à une température de l'eau supérieure ou égale à 15°C (Figure 2), seuil de température relevé antérieurement par d'autres auteurs (CAMPER *et al.*, 1991a; LeCHEVALLIER *et al.*, 1991).



**Figure 2:** Nombre de coliformes observés en fonction de la température de l'eau sur l'ensemble des sites du réseau 1.

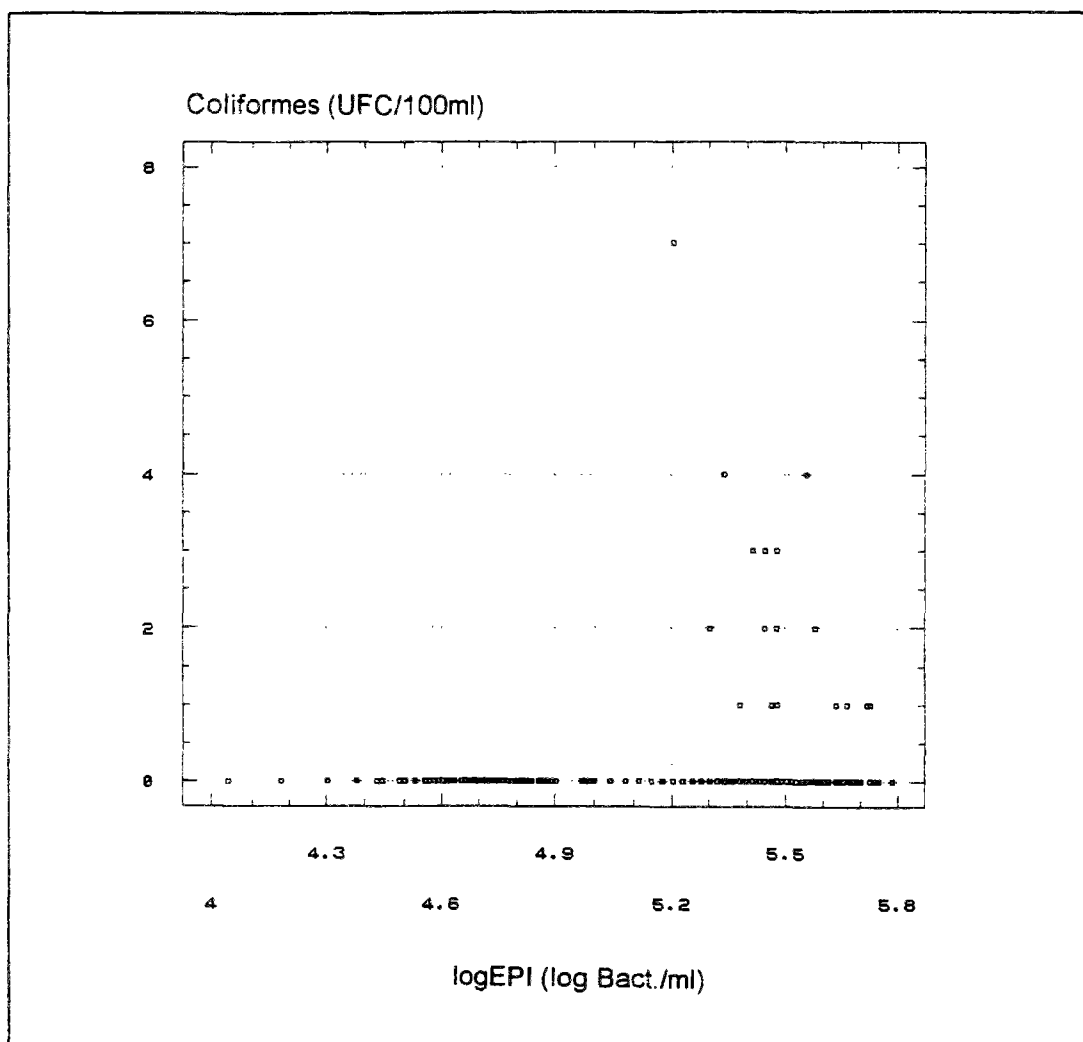
(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

**Figure 2:** Relationship between water temperature and coliform occurrences in the distribution system 1.

(Stage of study: February 1991 - February 1992)



- tous ces épisodes de présence de coliformes sont enregistrés lorsque le logarithme des dénombrements de la flore bactérienne en suspension par microscopie en épifluorescence (logEPI) atteint ou dépasse une valeur seuil de 5,2 (Figure 3).



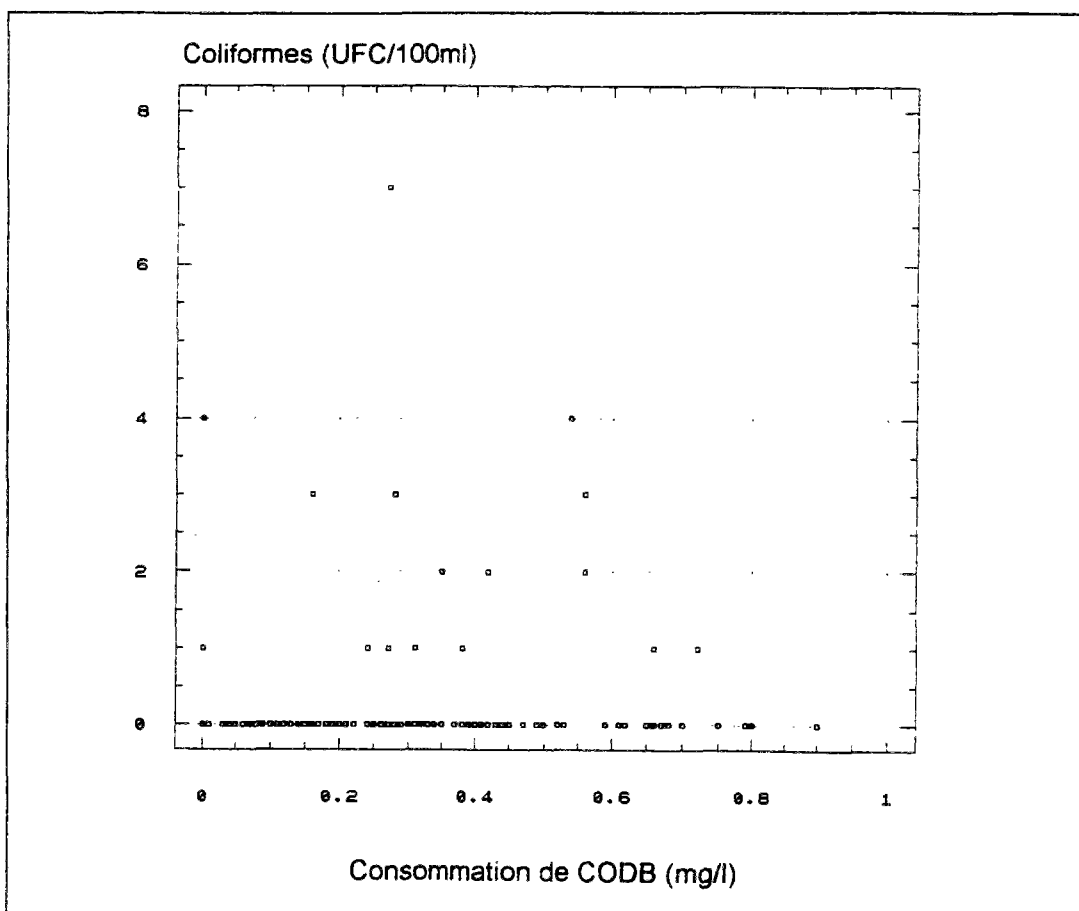
**Figure 3:** Nombre de coliformes observés en fonction des dénombrements bactériens en épifluorescence (logEPI) sur l'ensemble des sites du réseau 1.

(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

**Figure 3:** Relationship between epifluorescent counts and coliform occurrences in the distribution system 1.

(Stage of study: February 1991 - February 1992)

- 82% des cas d'apparition des coliformes sont associés à une consommation de CODB sur le réseau supérieure à 0,15 mg/l (Figure 4).



**Figure 4:** Nombre de coliformes observés en fonction de la consommation de CODB enregistrée sur l'ensemble des sites du réseau 1.

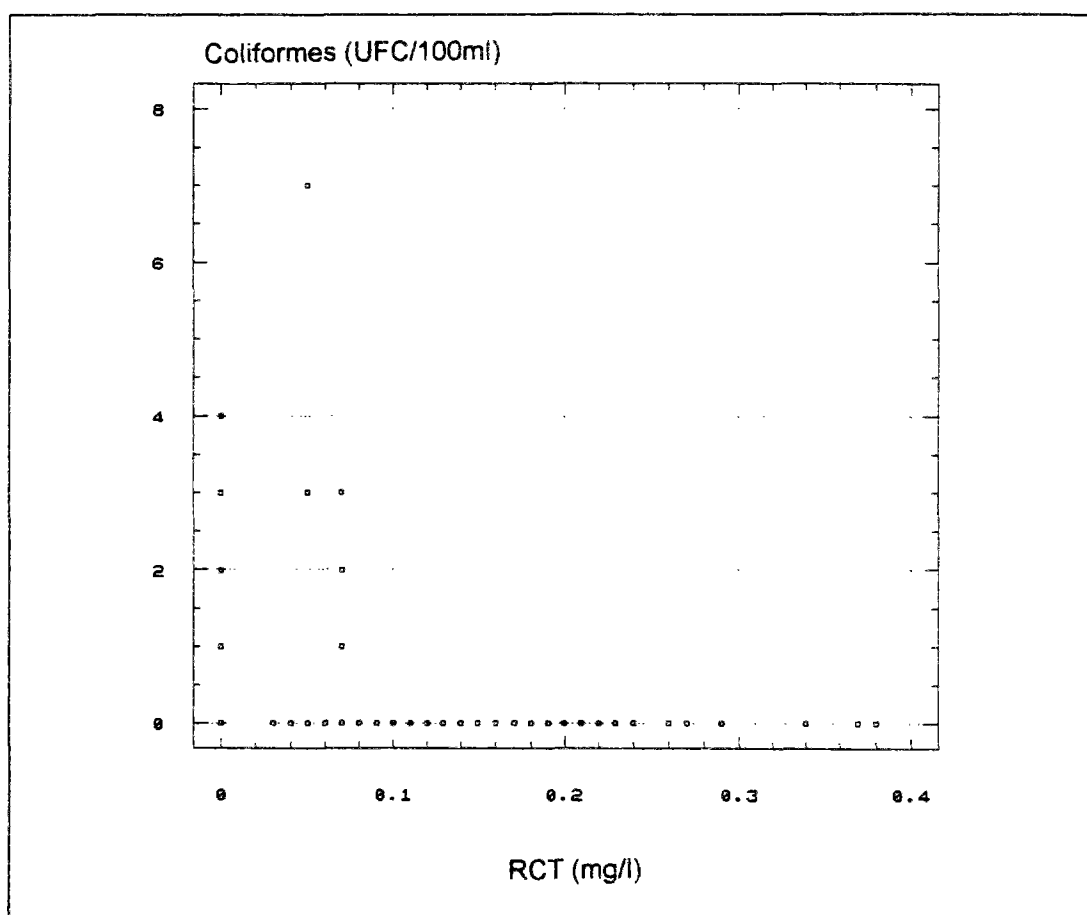
*(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)*

**Figure 4:** Relationship between BDOC consumption and coliform occurrences in the distribution system 1.

*(Stage of study: February 1991 - February 1992)*

Divers auteurs ont remarqué que la teneur en matière organique biodégradable était un facteur déterminant dans le phénomène de recroissance bactérienne (LeCHEVALLIER *et al.*, 1991; MATHIEU *et al.*, 1992; SERVAIS *et al.*, 1992; Van der KOOIJ, 1992). A titre d'exemple, Van der KOOIJ (1992) relie les concentrations de carbone organique facilement assimilable (COA) en sortie d'usine et les dénombrements bactériens dans différents réseaux de distribution. Il a été montré que la consommation de CODB le long d'un réseau de distribution est en relation avec des dénombrements bactériens importants et une absence de désinfectant (PREVOST *et al.*, 1991; CAPELLIER *et al.*, 1992; MATHIEU *et al.*, 1992; SERVAIS *et al.*, 1992). Selon MATHIEU *et*

al. (1992), en l'absence de désinfectant résiduel, une consommation de CODB de 0,10 mg/l conduit à une accumulation de  $7,5 \times 10^5$  Bact./ml dans le biofilm et de  $4 \times 10^4$  Bact./ml dans l'eau. -tous les cas de coliformes sont observés sur les sites où la concentration de chlore résiduel total est inférieure à 0,10 mg/l (Figure 5).



**Figure 5:** Nombre de coliformes observés en fonction de la concentration en résiduel de chlore total (RCT) sur l'ensemble des sites du réseau 1.

(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

*Figure 5: Relationship between total residual chlorine and coliform occurrences in the distribution system 1.*

(Stage of study: February 1991 - February 1992)

Nous avons cherché à élaborer un modèle prédictif d'apparition des coliformes simple basé sur le dépassement simultané de valeurs seuils (déterminées graphiquement) pour ces quatre paramètres. En conséquence, l'élaboration du modèle a été obtenue par combinaison des quatre critères de

risques suivants: la température avec une valeur seuil de 15°C, le résiduel de chlore total avec une concentration seuil de 0,10 mg/l, la consommation de CODB avec une concentration seuil de 0,15 mg/l et l'état de salissure bactériologique de l'eau(logEPI) avec une valeur seuil de 5,2. Nous avons rapporté dans le tableau 3, pour chacun des sites, le nombre de semaines où 0, 1, 2, 3 ou 4 valeurs seuils ont été dépassées simultanément ainsi que le nombre de cas d'apparition de coliformes correspondants. Pour l'ensemble des sites étudiés, le nombre total d'observations de coliformes était de 17. Soixante seize pour cent de ces cas (13/17) correspondaient à des sites dont les 4 valeurs seuils étaient dépassées simultanément. Aucun coliforme n'a été isolé sur les sites proches de l'usine (P1 et R1) qui ne présentaient, dans la plupart des cas, que 0, 1 ou 2 critères positifs. Sur les points de prélèvements R2 et R3 situés respectivement à 7 et 9 km de l'ouvrage de traitement, 2, 3 ou 4 valeurs seuils ont été souvent dépassées simultanément. Sur chacun de ces deux sites, des coliformes ont été isolés dans 5 cas pendant l'année d'étude. Le site P2, qui est le plus éloigné de l'usine de traitement (17 km), présentait la plupart du temps, 3 ou 4 critères positifs, et des coliformes ont été observés 7 fois durant l'année.

**Tableau 3:** Risque évalué (nombre de critères positifs) et apparition des coliformes sur les sites du réseau de distribution 1.

n: nombre de semaines où il y a isolement de coliformes sur le site

N: nombre de semaines avec x critères positifs sur le site

(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

**Table 3:** Evaluated risk (positive criterions) and coliform occurrences on different sites of distribution system 1.

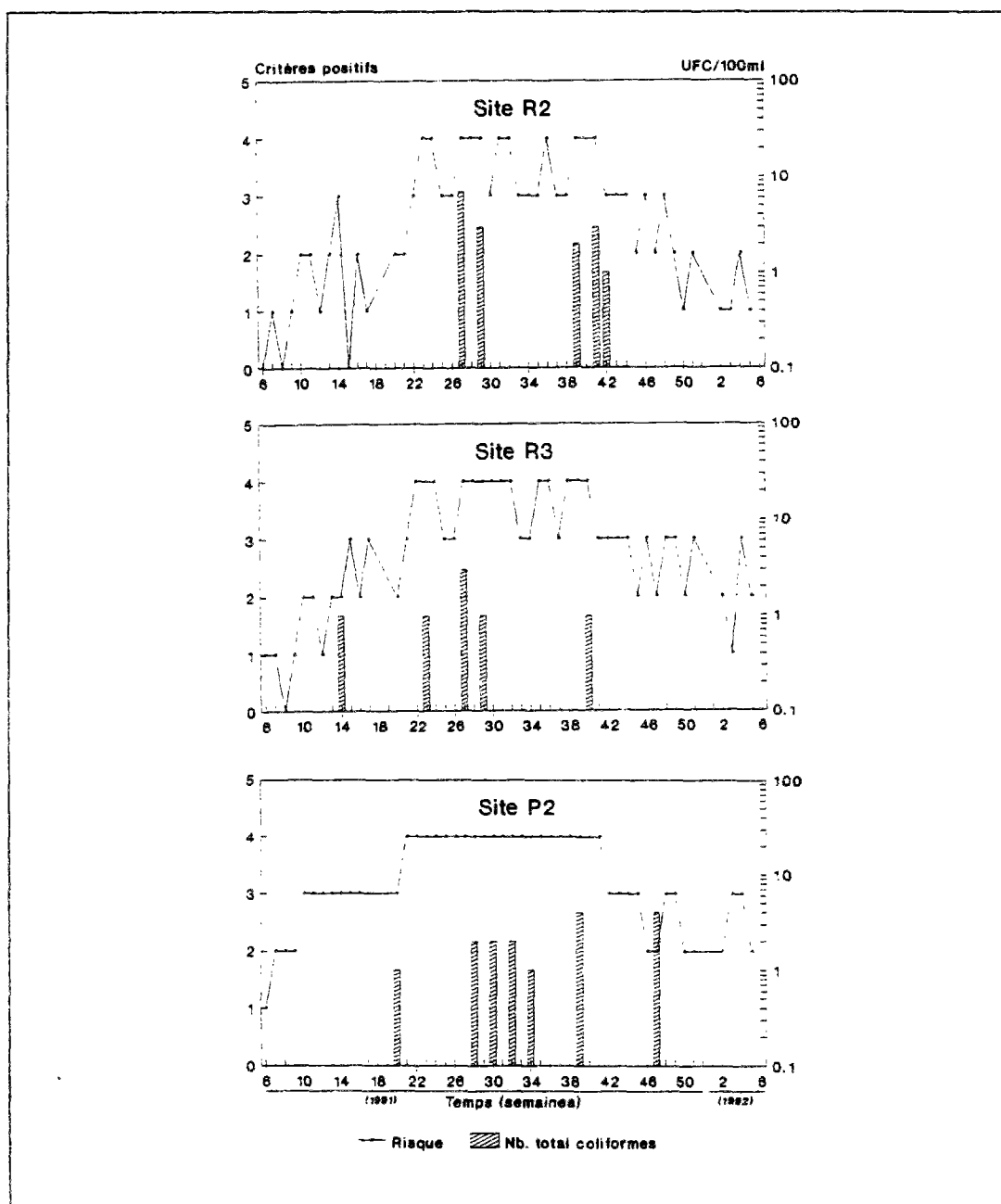
n: number of weeks with coliform observations

N: number of weeks with x positive criteria

(Stage of study: February 1991 - February 1992)

| Nombre de<br>critères<br>positifs | Ratio n / N |        |        |        |        |
|-----------------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
|                                   | Sites       |        |        |        |        |
|                                   | P1          | R1     | R2     | R3     | P2     |
| 4                                 | 0 / 0       | 0 / 7  | 4 / 10 | 4 / 13 | 5 / 20 |
| 3                                 | 0 / 0       | 0 / 10 | 1 / 15 | 0 / 17 | 1 / 17 |
| 2                                 | 0 / 9       | 0 / 9  | 0 / 11 | 1 / 11 | 1 / 9  |
| 1                                 | 0 / 18      | 0 / 10 | 0 / 8  | 0 / 5  | 0 / 1  |
| 0                                 | 0 / 20      | 0 / 11 | 0 / 3  | 0 / 1  | 0 / 0  |

La figure 6 montre l'apparition des coliformes et l'évaluation du risque (nombre de critères positifs observés simultanément) au cours du temps sur les sites R2, R3 et P2.



**Figure 6:** Risque d'apparition des coliformes (évalué par le nombre de critères positifs) et nombre de coliformes observés sur les sites R2, R3 et P2.

(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

*Figure 6: Risk of coliform occurrences (number of positive critetions) and observed coliforms on site R2, R3 and P2.*

(Stage of study: February 1991 - February 1992)

Il est intéressant de noter que pour chaque site, un risque élevé (trois ou quatre critères positifs) a été presque systématiquement observé au moins une semaine avant l'apparition des coliformes, ce qui confère un caractère prédictif au modèle établi. Cette observation est valable dans 100% des cas pour le point de prélèvement R2, 80% des cas pour le point R3 et 86% des cas pour le point P2. De même, sur ces sites, un risque de 4 critères positifs a précédé les apparitions de coliformes dans 60 - 70 % des cas.

Le modèle a été simplifié et 3 niveaux de risque ont été définis (tableau 4).

**Tableau 4:** Risque d'apparition des coliformes sur un site (réseau de distribution 1).  
(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

*Table 4: Risk of coliform occurrences on a site (distribution system 1).  
(Stage of study: February 1991 - February 1992)*

| <b>NOMBRE<br/>DE<br/>CRITERES<br/>POSITIFS</b> | Nombre de<br>semaines avec x<br>critères positifs | Nombre<br>d'observations des<br>coliformes | Fréquence | <b>RISQUE</b>                |
|--|---|--|-----------|------------------------------|
| 4  | 50  | 13   | 0,26      | Site EXPOSE                  |
| 3 - 2  | 108   | 4  | 0,04      | Site<br>FAIBLEMENT<br>EXPOSE |
| 1 - 0  | 77  | 0  | 0         | Site SANS<br>RISQUE          |

Le tableau 4 montre que l'augmentation de dépassements simultanés des valeurs seuils permet de définir les trois niveaux de risque d'exposition du site suivants:

- le dépassement de 4 valeurs seuils conduit à une fréquence d'observer des coliformes de 26%.

Le site est considéré "exposé" à l'apparition des coliformes.

- quand 2 ou 3 valeurs seuil sont dépassées, la fréquence d'isoler des coliformes est faible ( $f=4\%$ ) et le site est considéré comme "faiblement exposé".
- lorsqu'aucune ou une seule valeur seuil est dépassée, aucun coliforme n'étant isolé, le site est considéré "sans risque". Ce cas de figure correspond à des points de prélèvement où la présence de chlore ou (et) une température faible limitent l'activité biologique en amont (faible consommation du CODB, décrochement limité de bactéries du biofilm vers la phase eau).

## **B) Application du modèle AL COL lors du suivi de deux réseaux de distribution (seconde phase d'étude: avril - septembre 1992).**

### **1) Risque d'apparition des coliformes sur un site donné.**

Le modèle AL COL a été appliqué lors d'une étude complémentaire réalisée sur 2 réseaux alimentés par les ouvrages traitant les eaux de rivière de l'Oise (réseau 1) et de la Marne (réseau 2). Le nombre de sites étudiés était de 7 pour le réseau 1, et 10 pour le réseau 2. Cette étude a été réalisée sur une période de 21 semaines. Nous avons vérifié la validité des valeurs seuils associées à l'apparition des coliformes sur les différents sites pour les paramètres température, résiduel de chlore libre, consommation de CODB et logarithme des dénombrements en épifluorescence (Tableau 5). Pour le réseau 1, tous les cas de coliformes ont été associés à une température de l'eau supérieure à  $15^{\circ}\text{C}$ , une valeur de dénombrements bactériens ( $\log\text{EPI}$ ) supérieure à 5,2 ou à un résiduel de chlore libre inférieur à  $0,10\text{ mg/l}$ . Quatre vingt trois pour cent des cas de coliformes ont été associés à une consommation de CODB supérieure à  $0,15\text{ mg/l}$ . De même sur le réseau 2, 84 à 89 % des cas de coliformes ont été observés pour des valeurs seuils de  $15^{\circ}\text{C}$  (température), de 5 ( $\log\text{EPI}$ ), de  $0,10\text{ mg/l}$  (consommation de CODB) et de  $0,10\text{ mg/l}$  (résiduel de chlore libre). Il est intéressant de souligner que ces valeurs seuils sont identiques ou du même ordre de grandeur que celles déterminées lors de la première phase d'étude

(température: 15°C, logEPI: 5,2 (réseau 1) et 5 (réseau 2), consommation de CODB: 0,15 mg/l (réseau 1) et 0,10 mg/l (réseau 2), résiduel de chlore: 0,10 mg/l).

**Tableau 5:** seuils de risque et fréquences (f) d'apparition des coliformes sur les sites des réseaux de distribution 1 et 2.

$f = (\text{Nb. de cas de coliformes lorsque le critère est positif}) / (\text{Nb. total de cas de coliformes})$ .

(Phase d'étude: Avril - Septembre 1992)

**Table 5:** Risk thresholds and frequencies (f) of coliform occurrences on distribution systems 1 and 2.

$f = (\text{Nb. of cases of coliform occurrences and positive criterion}) / (\text{total of coliform occurrences})$ .

(Stage of study: April - September 1992)

|                        |   | Réseau 1        |       | Réseau 2        |       |
|------------------------|---|-----------------|-------|-----------------|-------|
|                        |   | Seuil de risque | f     | Seuil de risque | f     |
| Température            | > | 15              | 12/12 | 15              | 16/19 |
| (°C)                   |   |                 |       |                 |       |
| logEPI                 | > | 5,2             | 12/12 | 5               | 17/19 |
| (log Bact./ml)         |   |                 |       |                 |       |
| CODB <sub>cons.</sub>  | > | 0,15            | 10/12 | 0,10            | 17/19 |
| (mg/l)                 |   |                 |       |                 |       |
| Chlore <sub>res.</sub> | < | 0,10            | 12/12 | 0,10            | 16/19 |
| libre                  |   |                 |       |                 |       |
| (mg/l)                 |   |                 |       |                 |       |

Selon la même démarche que lors de la première phase d'étude, le caractère prédictif du modèle élaboré a été vérifié. Un risque combinant trois ou quatre critères positifs a été observé au moins une semaine avant l'apparition des coliformes dans 92% des cas sur les points de prélèvement du réseau 1, et dans 67% des cas pour les points de prélèvement du réseau 2 (résultats non présentés).



Le tableau 6 montre les différentes fréquences d'apparition des coliformes correspondantes aux trois niveaux de risque d'exposition des sites. Pour les 7 sites étudiés sur le réseau 1 pendant 21 semaines, 12 cas de coliformes ont été enregistrés. Neuf cas sont apparus sur des sites évalués "exposés" et 3 sur des sites "faiblement exposés". De même, pour les 10 sites contrôlés sur le réseau 2, 19 cas de coliformes ont été observés, dont 12 sur des sites "exposés", 6 sur des sites "faiblement exposés" et 1 sur un site "sans risque". La fréquence d'apparition des coliformes sur un site considéré comme "exposé" a été de 64% sur le réseau 1 et 57% sur le réseau 2. Cette fréquence n'a été que de 3% (réseau 1) et 6% (réseau 2) quand le site était jugé "faiblement exposé" et de 0% (réseau 1) et 1% (réseau 2) pour les sites qualifiés "sans risque". Sur ces deux réseaux confondus, la fréquence d'apparition des coliformes a donc été de 60% pour des sites évalués exposés, de 5% pour des sites évalués faiblement exposés et de 1% pour des sites considérés sans risque.

**Tableau 6:** Risque d'apparition des coliformes sur un site donné sur les réseaux 1 et 2.  
(Phase d'étude: Avril - Septembre 1992)

**Table6:** Risk of coliform occurrences on sites in distribution system 1 and 2.  
(Stage of study: April - September 1992)

| Nombre<br>de<br>critères<br>positifs | Sites réseau 1                             |   |                | Sites réseau 2                             |   |                | RISQUE                       |
|--------------------------------------|--|---|----------------|--|---|----------------|------------------------------|
|                                      | semaines<br>avec x<br>critères<br>positifs | Nombre<br>d'observations<br>de coliformes | Fré-<br>quence | semaines<br>avec x<br>critères<br>positifs | Nombre<br>d'observations<br>de coliformes | Fré-<br>quence |                              |
| 4                                    | 14   | 9   | 0,64           | 21   | 12  | 0,57           | Site<br>EXPOSE               |
| 3-2                                  | 87   | 3   | 0,03           | 95   | 6   | 0,06           | Site<br>FAIBLEMENT<br>EXPOSE |
| 1-0                                  | 22   | 0   | 0              | 76   | 1   | 0,01           | Site SANS<br>RISQUE          |

## **II) Maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau (cas du réseau 2).**

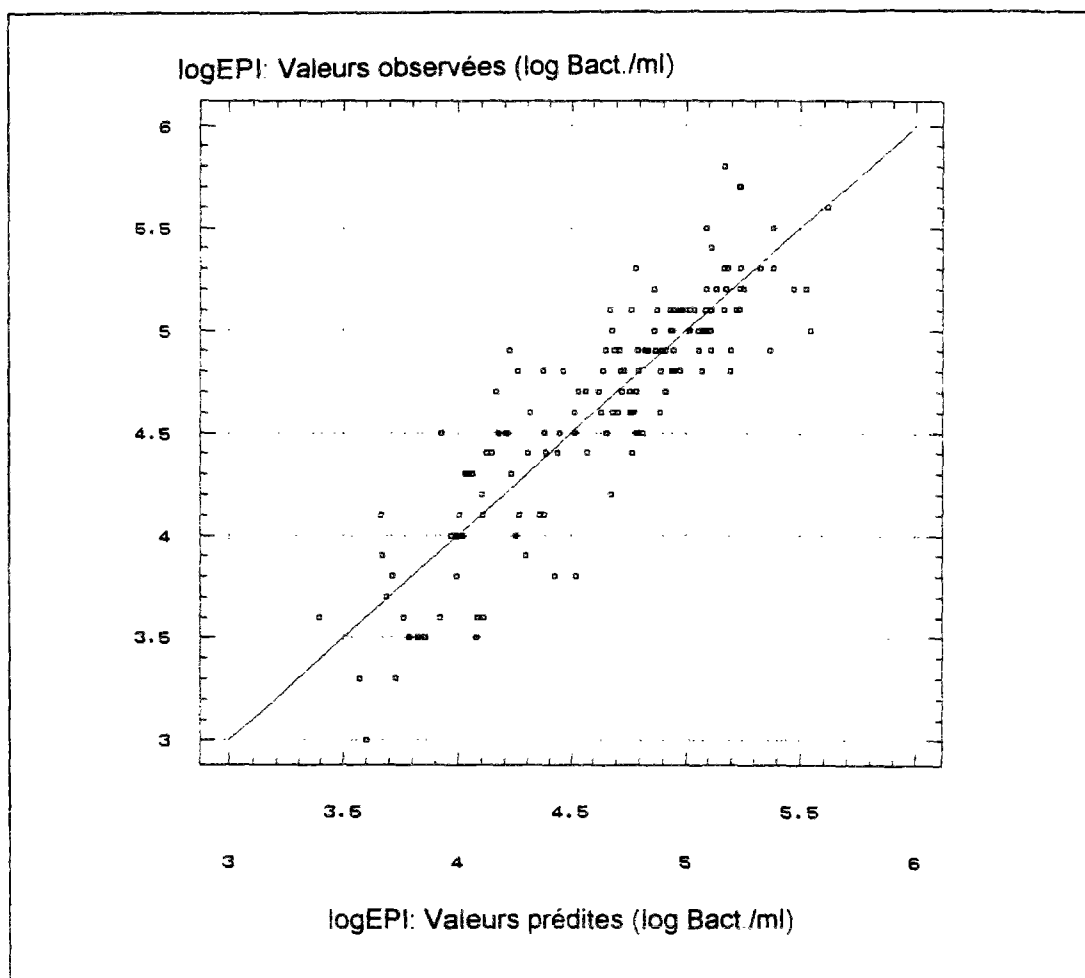
Ces résultats démontrent donc que le modèle AL COL permet d'évaluer le niveau d'exposition de différents sites d'un réseau à l'apparition des coliformes et de prédire les sites particulièrement exposés à l'apparition de ces germes. Il peut donc s'avérer un outil précieux pour adopter des mesures préventives ou correctives afin d'éviter ces épisodes. Tout réseau dont certains sites sont considérés comme "exposés" (4 critères positifs) devrait faire l'objet de mesures particulières (pour réduire ces risques) afin d'éviter l'apparition des coliformes les semaines suivant ces évaluations de risque élevé. Dans la mesure où la température et les valeurs de CODB en sortie d'ouvrage de traitement sont généralement difficilement maîtrisables, l'augmentation du résiduel de chlore reste la solution de choix pour limiter l'apparition des coliformes.

Durant cette étude et pour le réseau 2, nous avons établi que les dénombrements bactériens en épifluorescence observés une semaine donnée ( $\log EPI_{(t)}$ ) étaient fonction des dénombrements en épifluorescence enregistrés la semaine précédente ( $\log EPI_{(t-1)}$ ) et de la valeur de chlore résiduel libre maintenue sur le site (semaine t) ( $RCL_{\text{réseau}}$ ).

Pour le réseau 2, la formule est donnée par une régression linéaire multiple:

$$\log EPI_{(t)} = 0,73 \log EPI_{(t-1)} - 0,34 RCL_{\text{réseau}} + 1,41 \quad r^2 = 0,77 \quad n=210$$

La figure 7 représente la relation entre les valeurs prédites par cette relation et les valeurs réellement observées. Il est donc possible de maîtriser le niveau de qualité bactérienne de l'eau en modulant les quantités de chlore introduites dans le réseau. Cette approche permet de calculer, les valeurs de chlore résiduel libre à maintenir sur un site pour réduire le degré de salissure bactérienne d'un niveau observé à un niveau souhaité, dans un délai d'une semaine. Ainsi la diminution du logarithme des dénombrements bactériens ( $\log EPI$ ) de 5 à 4,9 sur un site peut être obtenue par le maintien d'un résiduel de chlore libre de 0,47 mg/l.



**Figure 7:** Relation entre le logarithme des dénombrements bactériens en épifluorescence observés ( $\log EPI_{(t)}$ ) et prédits par un modèle de régression linéaire multiple incluant le logarithme des dénombrements en épifluorescence de la semaine précédente ( $\log EPI_{(t-1)}$ ) et le résiduel de chlore libre ( $RCL_{réseau}$ ).

(Phase d'étude: Avril - Septembre 1992)

*Figure 7: Relationship between epifluorescent counts ( $\log EPI_{(t)}$ ) observed and predicted with a multiple linear regression model including epifluorescent counts one week earlier ( $\log EPI_{(t-1)}$ ) and residual chlorine ( $RCL_{réseau}$ ).*

(Stage of study: April - September 1992)

### C) ELABORATION DU MODELE DE RISQUE MOYEN D'APPARITION DES COLIFORMES SUR L'ENSEMBLE DES SITES.

Pour une semaine donnée, nous avons associé le risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des points de prélèvement à la moyenne des critères positifs enregistrés sur l'ensemble de ces points.

Pour les deux réseaux de distribution étudiés (réseau 1: février 1991- février 1992, avril - septembre 1992; réseau 2: avril - septembre 1992), le nombre de semaines (n) où des coliformes ont été isolés sur chacun des deux réseaux et le nombre de semaines (N) où le risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites avait été évalué à un certain niveau, ont été reportés dans le tableau 7.

Tableau 7: Risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites pour des réseaux de distribution 1 (Février 1991- Février 1992; Avril - Septembre 1992) et 2 (Avril - Septembre 1992).

n: nombre de semaines où il y a isolement de coliformes sur le réseau.

N: nombre de semaines avec une moyenne de x critères positifs sur les différents sites.

Tableau 7: Mean risk of coliform occurrences on the whole sites for distribution systems 1 (February 1991- February 1992; April - September 1992) and 2(April - September 1992).

n: number of weeks with coliform observations on the network.

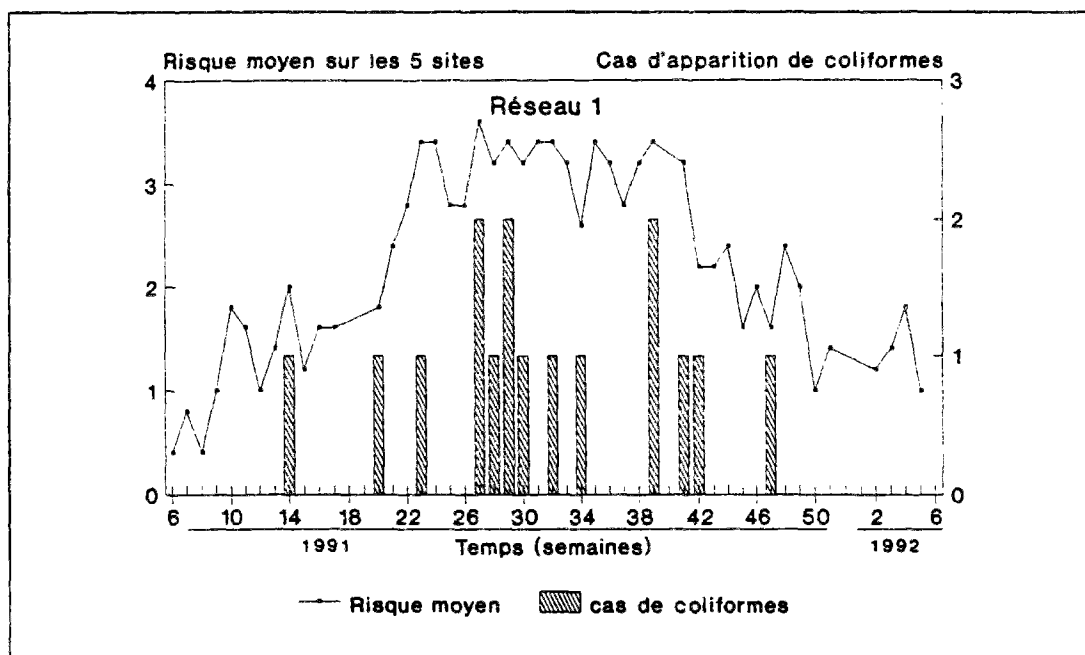
N: number of weeks with a mean of x positive criteria on the different sites.

| Moyenne des critères positifs | Ratio n/N                         |                                    |                                    | Risque moyen    |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
|                               | Réseau 1<br>(Fév. 1991-Fév. 1992) | Réseau 1<br>(Avril-Septembre 1992) | Réseau 2<br>(Avril-Septembre 1992) |                 |
| [3 - 4]                       | 8 / 14                            | 1 / 3                              | 2 / 2                              | Maximum         |
| [2 - 3[                       | 3 / 13                            | 4 / 4                              | 5 / 8                              | Critique        |
| [1 - 2[                       | 2 / 17                            | 0 / 5                              | 3 / 11                             | non négligeable |
| [0 - 1[                       | 0 / 3                             | 0 / 0                              | 0 / 0                              | minimum         |

La fréquence d'observation des coliformes a augmenté d'autant plus que la moyenne des critères positifs pour l'ensemble des sites était élevée. En conséquence, quatre niveaux de risques moyens d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites ont été établis (tableau 7):

- le risque a été considéré "maximum" lorsque la moyenne des critères positifs sur l'ensemble des sites était supérieure ou égale à 3,
- le risque a été "critique" pour une moyenne des critères positifs comprise entre 2 et 3,
- le risque a été évalué "non négligeable" quand le nombre de critères positifs moyen était compris entre 1 et 2,
- le risque a été considéré minimum pour une moyenne des critères positifs inférieure à 1.

Au total, 82% des cas de coliformes (23 cas sur 28) ont été observés pour des risques moyens évalués "maximum" et "critique". L'évolution simultanée au cours du temps des apparitions de coliformes sur le réseau et du risque moyen (Figure 8) met bien en évidence que la majorité des observations de ces germes a été enregistrée lorsque la moyenne des critères positifs sur les différents sites était supérieure à 2 (risques "maximum" ou "critique"). De plus, des niveaux de risques "maximum" ou "critique" ont été enregistrés au moins une semaine avant l'apparition des coliformes sur le réseau dans 84 % des cas.



**Figure 8:** Risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites (moyenne des critères positifs) et nombre de cas d'apparition des coliformes sur le réseau 1  
(Phase d'étude: Février 1991 - Février 1992)

*Figure 8: Mean risk of coliform occurrences on the whole sites ( mean number of positive criterions) and coliform occurrences on distribution system 1.  
(Stage of study: February 1991 - February 1992)*

L'ensemble des résultats (Tableau 7 et figure 8) montre que des risques moyens d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites évalués "maximum" ou "critique" doivent faire l'objet de mesures de désinfection afin de limiter l'apparition de ces germes dans le réseau.

## **Conclusions**

Cette étude a permis de mieux comprendre et de prévoir les apparitions de coliformes dans les réseaux de distribution.

La première phase de travail, basée sur le contrôle hebdomadaire pendant 47 semaines de paramètres bactériologiques (dénombrement des bactéries en épifluorescence, dénombrement des coliformes) et physico-chimiques (température, résiduel de chlore, CODB) sur l'eau en sortie d'une usine de potabilisation et sur 5 sites d'un réseau de distribution a permis d'établir une relation entre la fréquence d'apparition des coliformes sur un site de prélèvement et le dépassement de seuils critiques pour 4 paramètres :

- la température avec une valeur seuil de 15°C,
- la consommation de CODB avec une valeur seuil de 0,15 mg/l
- le niveau de salissure bactériologique évalué par dénombrement microscopique en épifluorescence (logEPI) avec un seuil de 5,2.
- le résiduel de chlore avec une valeur seuil de 0,10 mg/l.

Le nombre de dépassements simultanés de ces seuils critiques a permis de déterminer 3 niveaux de risques (site "sans risque", "faiblement exposé", "exposé") selon le nombre de dépassements des valeurs seuils pour ces 4 paramètres et en relation avec une fréquence croissante d'apparition des coliformes sur les sites du réseau.

Durant la seconde phase d'étude, ce modèle a été mis en application sur deux réseaux. Les valeurs seuils d'apparition des coliformes obtenues sur ces 2 réseaux ont été identiques ou du même ordre de grandeur que celles observées lors de la première phase d'étude. La majorité des cas de coliformes a été observée sur des sites évalués "exposés" (76% des cas sur le réseau 1 lors de la première phase d'étude, 75% des cas sur le réseau 1 et 63% des cas sur le réseau 2 lors de la seconde phase d'étude). Les risques évalués sur un site ont été généralement élevés les semaines qui précédaient l'apparition des coliformes sur ce site. Cette observation a montré le caractère prédictif du modèle AL COL.

Il a été aussi possible de définir quatre niveaux de risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites (correspondant à la moyenne des dépassements de seuils critiques enregistrés sur les différents sites). Ces quatre risques (minimum, non négligeable, critique et maximum) ont été en relation avec des fréquences croissantes d'apparition des coliformes sur le réseau.

Le modèle AL COL peut donc s'avérer un outil efficace dans la maîtrise de la qualité bactériologique des réseaux de distribution. En effet, tout réseau présentant des sites considérés "exposés" ou un risque moyen d'apparition des coliformes sur l'ensemble des sites évalué "maximum" ou "critique" devrait faire l'objet de mesures immédiates (chloration) afin de réduire ces risques et éviter l'apparition des coliformes.

Par ailleurs, il a été possible, à partir d'une régression linéaire multiple, de définir un niveau de chlore à maintenir pendant une semaine afin de maîtriser le niveau de salissure bactériologique et l'apparition des coliformes sur un site du réseau.

Le modèle AL COL, reposant sur des paramètres dont la détermination s'avère facile à mettre en oeuvre, sera d'une grande aide au contrôle et à l'amélioration de la qualité des eaux de distribution.

## Remerciements

Les auteurs remercient Monsieur Jean-Claude BLOCK (faculté de pharmacie de Nancy) pour ses précieux commentaires.

## Références.

AFNOR NF 90-414: Essais des eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par filtration sur membrane. Oct. 1985. AFNOR, Paris.

ALLEN M.J., TAYLOR R.H. and GELDREICH E.E., 1980. The occurrence of microorganisms in water main encrustations. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **72**: 614-625.

BLOCK J.C., HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., MIAZGA J. and LEVI Y., 1993. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling*; **6**: 333-343.

BOURBIGOT M.M., DODIN A. and LHERITIER R., 1984. La flore bactérienne dans un réseau de distribution. *Wat. Res.*; **18**: 585-591.

BOUWER E.J. and CROWE P.B., 1988. Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **80**: 82-92.

BRYERS J.D., 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilm. *Biotechnol. Progress*; **3**: 57-68.

CAMPER A.K., GOLDSTEIN B., SZEGO S., PEYTON B., DRURY W., MUELLER R., ZELVER N. et CHARACKLIS W.G., 1991a. Ecophysiologie des biofilms microbiens dans les réseaux de distribution d'eau. *T.S.M. l'Eau*; **9**: 428.

CAMPER A.K., Mc FETERS G.A., CHARACKLIS W.G. and JONES W.L., 1991b. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Appl. Envir. Microbiol.*; **57**: 2233-2239.



- CAPELLIER M., PICOCHÉ C., NOVAC S. et DEGUIN A., 1992. Devenir du CODB dans le réseau de distribution: étude de deux cas. *Sci. Eau*; **5**: 51-67.
- COALLIER J., LAFRANCE P., DUCHESNE D. et LAVOIE J., 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable. *Sci. Tech. Eau*; **22**: 63-72.
- DONLAN R.M. and PIPES W.O., 1988. Selected drinking water characteristics and microbial population density. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **80**: 70-76.
- EDBERG S.C. and SMITH D.B., 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. *Appl. Envir. Microbiol.* ; **55**: 380-384.
- GELDREICH E.E. and RICE E.W., 1987. Occurrence, significance and detection of *Klebsiella* in water systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **79**: 74-80.
- GOSHSKO M.A., PIPES W.O. and CHRISTIAN R.R., 1983. Coliforms occurrence and chlorine residual in small water distribution systems. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **75**: 371-374.
- HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., FRANCAIS T., HARTEMANN P., GRAPIN G., COLIN F., JOURDAIN M.J., BLOCK J.C., CHERON J., PASCAL O., LEVI Y. et MIAZGA J., 1988. Biofilm growth in drinking water network: a preliminary industrial pilot plant experiment. *Water Sci. Technol.*, **20**: 109-115.
- JORET J.C. et LEVI Y., 1986. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*; **39**: 3-9.
- LECHEVALLIER M.W., 1990. Coliform regrowth in drinking water: a review. *J. Am. Wat. Works. Ass.*; **82**: 74-86.
- LECHEVALLIER M.W., BABCOCK T.M. and LEE R.G., 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Envir. Microbiol.*; **53**: 2714-2724.
- LECHEVALLIER M.W., OLSON B.H. and Mc FETERS G.A. editors, 1990. Assessing and controlling bacterial regrowth in distribution systems. AWWARF, Denver, COL.

LECHEVALLIER M.W., SHULZ W. and LEE R.G., 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**: 857-862.

MATHIEU L., PAQUIN J.L., BLOCK J.C., RANDON G., MAILLARD J. et REASONER D., 1992. Paramètres controlant la prolifération des bactéries dans les réseaux de distribution. *Sci. Eau*, **5**: 91-112.

PAYMENT P., GAMACHE F. and PAQUETTE G., 1988. Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. *Can. J. Microbiol.*, **34**: 1304-1309.

PREVOST M., DESJARDIN R., DUCHES D. et COALLIER J., 1991. L'effet de la demande en chlore et de l'enlèvement du carbone organique dissous biodégradable (CODB) sur la recroissance bactérienne. *T.S.M, l'Eau*, **9**: 446.

RODIER, J. 1984. L'analyse de l'eau. (Eaux naturelles - Eaux résiduaires - Eaux de mer). 7th ed.; DUNOS ed., Paris.

SERVAIS P., BILLEN G., LAURENT P., LEVI Y. et RANDON G., 1992. Etude de la dynamique du CODB et des bactéries dans un réseau de distribution de la banlieue Nord de Paris. *Sci. Eau*, **5**: 69-89.

VAN der KOOIJ D., 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Wat. Works. Ass.*, **84**: 57-65.

VAN der WENDE E., CHARACKLIS W.G. and SMITH D.B., 1989. Biofilm and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.*, **23**: 1313-1322.

VENTRESQUE C. and BABLON G., 1989. Ozone, a mean of stimulating activated carbon reactors. *Proc. 9th Ozone World Congress IOA*, New York.



## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

*Actuellement, les filières de traitement de potabilisation des eaux de surface ne permettent pas d'éliminer une quantité de matière organique biodégradable suffisante pour assurer la stabilité chimique et biologique de l'eau au cours de sa distribution. Il s'ensuit un phénomène de reviviscence bactérienne dans les réseaux d'eau d'alimentation. Souhaitant apporter quelques éléments de réponse posés par la présence de matière organique biodégradable dans les eaux de consommation, cette étude s'est focalisée plus particulièrement sur le carbone organique dissous biodégradable tant du point de vue de sa mesure, que de son évolution au cours des traitements d'oxydation et le long des réseaux de distribution.*

*La première partie du travail a porté sur la signification de la mesure du CODB, en terme de méthode d'évaluation de la matière organique biodégradable, et vis à vis du potentiel de recroissance bactérienne des eaux.*

- D'un point de vue quantitatif, le résultat de CODB mesuré a différé selon la technique utilisée, et pour une technique donnée selon les conditions expérimentales appliquées au cours du test (méthodes utilisant un inoculum de bactéries soit fixées ou en suspension).

Les concentrations de CODB mesurées par incubation des échantillons d'eau en présence d'un inoculum bactérien naturel fixé sur du sable ont dépendu à la fois de la quantité d'inoculum ajouté et de la pratique d'une aération durant l'incubation. L'utilisation d'un ratio sable:eau de 100g : 300 ml, en milieu aéré, a permis une cinétique de dégradation du COD rapide (85 % des échantillons ont atteint la valeur minimale de COD en moins de 8 jours). Le phénomène d'adsorption de COD sur le sable a été estimé à au moins 0,10 - 0,20 mg COD pour 100 g de sable. De plus, la pratique d'une aération (2 - 4 l/h) des échantillons lors de l'incubation a conduit à une augmentation de 30 % des valeurs de CODB par rapport à celles obtenues sans aération.

La biodégradation de la matière organique de l'eau par des bactéries en suspension (1 % d'eau de Seine) est un phénomène très lent. Dans le cas d'échantillons d'eau ayant préalablement subi un traitement biologique (effluents de filtres biologiques), le résultat de mesure de la fraction biodégradable a augmenté de 100-125 % lorsque la période d'incubation a été prolongée de 28 jours à 85-120 jours. Des variations dans la taille de l'inoculum (de 0,04% à 5%) ainsi que l'aération des échantillons pendant l'incubation n'ont pas affecté la valeur de CODB mesurée.

Ces deux méthodes d'évaluation de la matière organique biodégradable utilisant un inoculum bactérien naturel fixé ou en suspension ont donné des résultats de CODB corrélés:  $CODB_{susp.} = 0,61 CODB_{fix.} - 0,05$  ( $r=0,93$ ;  $n=30$ ). Une population de bactéries fixées a été capable de dégrader des composés réfractaires à une flore en suspension. Finalement, le choix de l'utilisation d'une de ces deux techniques dépend d'impératifs de temps (incubation de 28 jours pour un inoculum en suspension contre 6-8 jours en présence de sable colonisé) et des moyens techniques dont on dispose (dispositif d'aération...). On doit aussi tenir compte du fait que la technique faisant appel à des bactéries fixées nécessite un suivi quotidien de la décroissance du COD, une légère augmentation des valeurs de COD (0,04-0,42 mg/l) étant observée quelques jours après l'obtention de la valeur minimale de COD.

- La mesure du CODB par la technique mettant en oeuvre des bactéries fixées constitue un bon indicateur du potentiel de recroissance bactérienne d'une eau puisqu'elle a permis de prédire à 90% le maximum de croissance d'une flore naturelle mixte dans des échantillons d'eau d'origines diverses. Le rendement de croissance a été alors de  $1,7 \times 10^9$  cellules par mg de CODB. Avec utilisation de l'index acétate, les valeurs de CODB et de COA (P17, P17 + NOX) dans différents types d'eau ont conduit à des résultats concordant dans 50 à 60 % des cas, avec des valeurs de CODB toujours supérieures à celles de COA (1 mg de CODB a correspondu à 90-140  $\mu g$  C eq. acétate). Le COA doit donc être considéré comme un index de la quantité de matière organique biodégradable dont la valeur réelle peut être approchée par la mesure de CODB.

***La seconde partie de ce travail a consisté à quantifier la production de CODB (mesuré par la technique mettant en oeuvre des bactéries fixées) lors de l'oxydation***

***d'échantillons d'eau de rivière ou d'effluents de filtre à sable par différents traitements d'ozonation.***

Les différents tests d'oxydation ont été réalisés afin de quantifier la formation de MOB après traitement par l'ozone et de comparer l'effet de l'ozone seul et couplé au peroxyde d'hydrogène ou à un catalyseur (TiO<sub>2</sub>).

- L'oxydation d'échantillons d'eau naturelle par l'ozone a conduit à la formation de composés biodégradables au détriment de la fraction réfractaire du COD. L'optimum de production de CODB a été obtenu pour des taux de traitement intermédiaires (0,5 - 1 mg O<sub>3</sub>/mg COD) et pour des temps de contact courts (5-10 min.). Pour observer une formation maximale de CODB, un fort taux de traitement associé à un temps de contact court a été préférable à un traitement plus long avec une dose d'ozone plus faible. La minéralisation de COD a été négligeable après traitement par l'ozone seul.

- Lorsque le peroxyde d'hydrogène a été couplé à l'ozone, un ratio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> de 0,35-0,45, optimum pour la dégradation de pesticides (comme l'atrazine), a aussi été efficace pour l'oxydation de la matière organique. Pour les 2 types d'eau naturelle étudiés, les cinétiques de formation de CODB en fonction de la dose d'oxydant ont suivi le même profil après traitement par l'ozone et par l'ozone peroxyde. Cependant pour un taux de traitement identique, l'ozone seul a conduit à des valeurs de CODB sensiblement plus fortes que le système ozone - peroxyde d'hydrogène, celui-ci ayant entraîné une légère minéralisation du COD (10 % du COD minéralisé).

- L'ozonation catalytique induit une minéralisation importante du COD (abattement de 25% du COD pour un taux d'ozone appliqué de 2,5 mg O<sub>3</sub> / mg COD; pour un taux de traitement identique, ce rendement n'a pas dépassé pas 15 et 18% avec l'ozone et le système ozone - peroxyde d'hydrogène) (cas d'une solution synthétique d'acides fulviques). Ceci a conduit à une formation de CODB nettement plus faible dans l'eau ozonée en présence de catalyseur, par rapport à l'ozone seul ou couplé au peroxyde d'hydrogène. L'intégration de l'ozone catalytique dans les filières de potabilisation en amont des filtres biologiques devrait permettre une réduction importante de la teneur en matière organique de l'eau.

***Finalement, la troisième partie du travail a porté sur la relation existant entre la présence de CODB dans l'eau et le phénomène de reviviscence bactérienne observé dans les réseaux de distribution.***

Cette étude de terrain, basée sur le suivi hebdomadaire (pendant un an) de différents paramètres de qualité de l'eau en plusieurs points de prélèvement d'un réseau de distribution avait comme objectifs:

- \* d'apprécier les variations de la qualité bactériologique de l'eau et de certains paramètres physico-chimiques le long du réseau,
- \* de définir des critères de risque d'apparition des coliformes.

- Les trois paramètres clés qui gouvernent la recroissance bactérienne sont la température de l'eau, sa concentration en résiduel de chlore et sa teneur en matière organique biodégradable. En effet, le phénomène de recroissance bactérienne, observé tout au long de l'année, a augmenté avec la température (valeurs moyennes de dénombrements des bactéries en suspension de 1,5 à 5 fois plus fortes pour des températures de l'eau supérieures à 15 °C) et l'absence de désinfectant. A partir de cette observation, les variations de la qualité bactériologique de l'eau, évaluée par dénombrements microscopiques en épifluorescence ou par culture sur milieu R2A, ont été prédites respectivement à 63 % et 72% par un modèle de régression linéaire multiple incluant la concentration de résiduel de chlore et la température de l'eau. Par ce modèle, le résiduel de chlore nécessaire pour inactiver les bactéries en suspension cultivables sur milieu gélosé a été estimé à 0,5 mg/l.

La recroissance bactérienne s'est accompagnée d'une consommation progressive de CODB le long du réseau de distribution. La consommation moyenne de CODB dans le réseau a été prédite à 54% à partir de deux paramètres, la température et la teneur en CODB dans l'eau en sortie de l'usine de traitement. La stabilité biologique de l'eau (définie pour une consommation de CODB nulle) a été obtenue pour des concentrations de CODB dans l'eau en sortie d'usine très faibles (0,15 mg/l et 0,30 mg/l pour des températures respectives de 20 °C et 15 °C). Une consommation de CODB de 0,10 mg/l s'est traduit par une augmentation du nombre de bactéries en suspension de l'ordre de  $10^4$  bact./ml.

- La recroissance bactérienne s'est parfois accompagnée de l'apparition de coliformes en certains sites du réseau de distribution. Nous avons observé une relation entre la fréquence

d'apparition des coliformes et le dépassement d'une valeur seuil pour les 4 paramètres suivants:

- \* la température de l'eau, avec une valeur seuil de 15°C.
- \* la consommation de CODB le long du réseau, avec une valeur seuil de 0,15 mg/l
- \* le niveau de salissure bactériologique du réseau évalué par le logarithme décimal des dénombrements au microscope en épifluorescence, avec une valeur seuil de 5,2.
- \* le résiduel de chlore, avec une valeur seuil de 0,10 mg/l.

Le degré d'exposition des sites du réseau a pu être estimé par comptabilisation des dépassements des seuils critiques pour ces quatre paramètres. Nous avons élaboré un modèle de risque d'apparition des coliformes sur les sites du réseau (modèle AL COL) basé sur le fait que la fréquence d'observation des coliformes a été d'autant plus importante que le nombre de dépassements simultanés de seuils critiques était élevé.

Trois degrés de risque d'apparition des coliformes sur un site ont été définis : site "sans risque" quand 0 ou 1 seule valeur seuil a été dépassée, site "faiblement exposé" quand 2 ou 3 valeurs seuils ont été dépassées et site "exposé" quand 4 valeurs seuils ont été dépassées.

Il a aussi été possible de définir quatre niveaux de risque moyen d'apparition des coliformes sur le réseau (minimum, non négligeable, critique et maximum), correspondant à la moyenne des dépassements des seuils critiques enregistrés sur les différents sites pour une semaine donnée.

La majorité des cas de coliformes a donc été observée pour des risques élevés. De plus, dans la plupart des cas, le risque d'apparition des coliformes en un site donné a été estimé élevé les semaines qui précédaient l'apparition des coliformes sur ce site. Cette observation a montré le caractère prédictif du modèle établi.

Le modèle AL COL a permis d'évaluer le degré d'exposition d'un réseau à l'apparition des coliformes et de prédire les sites particulièrement exposés à l'apparition de ces germes. Il s'agit donc d'un outil efficace pour la maîtrise de la qualité bactériologique des réseaux de distribution. En effet, tout réseau présentant des sites "exposés" et un risque moyen sur le réseau évalué "critique" ou "maximum" devrait faire l'objet de mesures immédiates de désinfection (augmentation du résiduel de chlore en sortie d'usine, ou sur une zone du réseau exposée, rinçage, mise en place de postes de rechloration, actions au niveau de la filière de



traitement) afin de réduire ces risques et d'éviter l'apparition des coliformes sur le réseau (Figure 1).

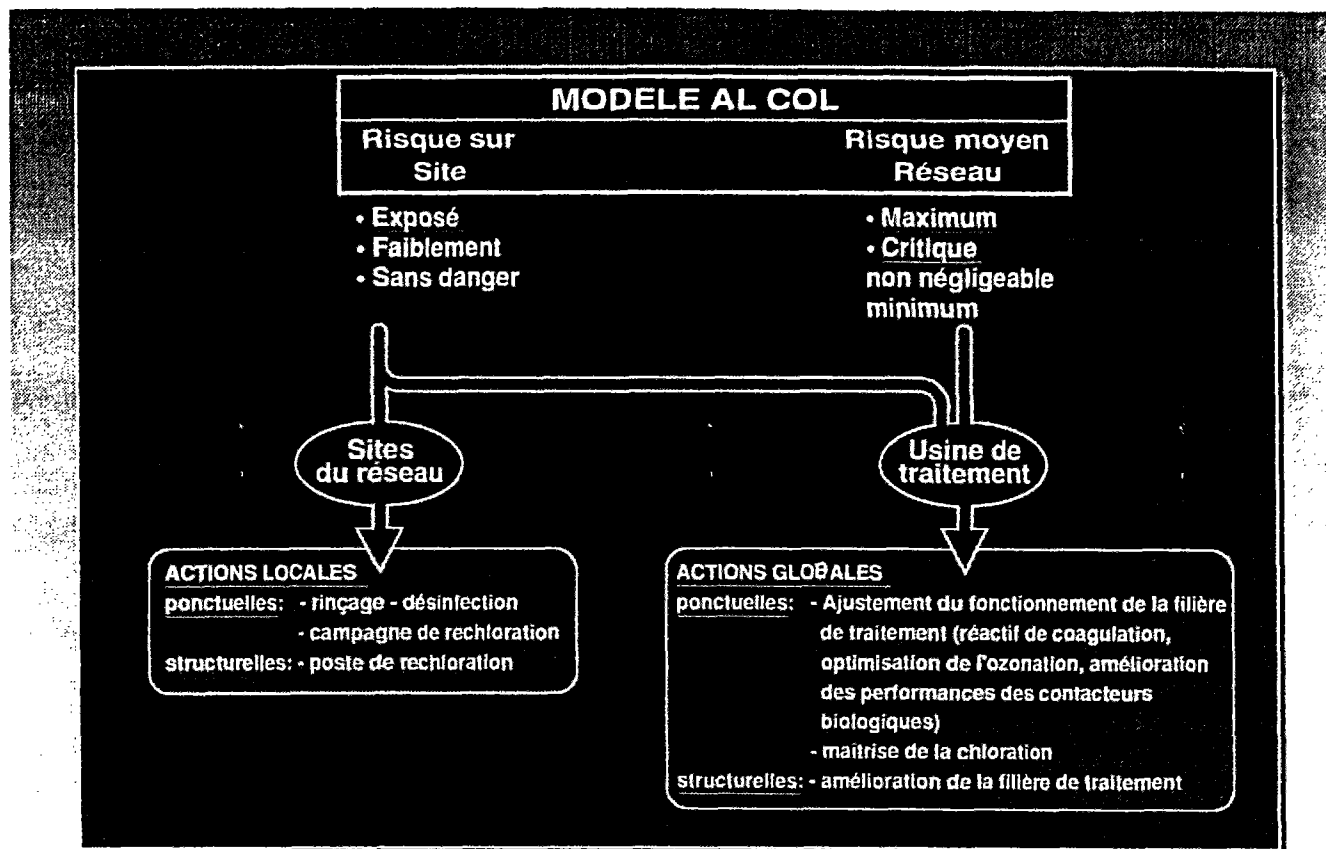


Figure 1: Actions types envisageables à partir des risques évalués par le modèle d'alerte AL COL.

*Ces résultats constituent une contribution au problème actuel de reviviscence bactérienne et présentent des perspectives intéressantes dans le cadre de l'optimisation du traitement et de la distribution des eaux d'alimentation, de la maîtrise de l'apparition des coliformes et d'une définition plus précise de la MOB.*

- La teneur en CODB s'étant avérée être un paramètre clé dans la recroissance bactérienne, la maîtrise de la qualité bactériologique de l'eau dans les réseaux de distribution implique donc:

*\* une optimisation plus poussée des rendements d'élimination de la matière organique au cours des différentes étapes de traitement, notamment par une maîtrise de la quantité de CODB formée lors de l'ozonation, puis éliminée par filtration biologique.* Afin de maintenir la stabilité biologique au cours de la distribution, il est possible de dégager certaines consignes d'exploitation relatives aux différentes étapes d'ozonation pratiquées au cours de la potabilisation des eaux. Dans les traitements d'ozonation d'une eau de rivière (étape de pré-ozonation visant à réduire la couleur de l'eau, oxyder certaines molécules minérales, ou améliorer la clarification...), les faibles taux d'ozonation appliqués (0,2 mg O<sub>3</sub>/mg COD) conduisent à une production limitée de matière organique biodégradable qui est aisément éliminable lors des étapes ultérieures du traitement de l'eau. Par contre, les conditions d'ozonation d'eaux partiellement traitées (étape d'inter-ozonation visant à oxyder certains micropolluants) correspondent aux conditions optimales de production de MOB (0,5 - 1 mg O<sub>3</sub>/mg COD). Pour maintenir une stabilité biologique de l'eau, il est donc souhaitable d'adapter les taux d'ozonation appliqués en fonction des objectifs recherchés et des performances des contacteurs biologiques (concentration maximales admissibles en micropolluants, seuils d'abattement de la MOB). De même, l'usage de l'ozone comme désinfectant (étape de post-ozonation pour l'inactivation des virus, des bactéries pathogènes et de certains parasites) conduit aussi à une production optimale de MOB. La stabilité biologique demande alors la mise en place, soit d'un procédé d'affinage puissant (filtration biologique, nanofiltration), soit d'un traitement par un oxydant à effet rémanent (chlore, bioxyde de chlore, chloramines...).

*\* le contrôle et la prévention des phénomènes de dégradation de la qualité de l'eau le long des réseaux de distribution.* Actuellement, la production à l'échelle industrielle d'une eau exempte de matière organique (CODB<sub>usine</sub> < 0,15 mg/l) étant très difficile, le chlore reste donc la solution adéquate pour limiter la recroissance bactérienne. Grâce à un usage raisonné du chlore, le modèle prédictif de l'apparition des coliformes (AL COL), que nous avons élaboré, permet d'obtenir un compromis entre l'absence de coliformes et l'impératif de ne pas dépasser les concentrations maximales admissibles de THM ainsi que de ne pas voir apparaître de mauvais goûts. Testé sur différents réseaux de distribution de la banlieue

parisienne lors de "campagnes prédictives", ce modèle a permis la réduction des épisodes d'apparition de coliformes lors de la période estivale.

Néanmoins, certaines améliorations du modèle AL COL sont possibles afin d'en faire une aide déterminante en matière de gestion de la distribution de l'eau. Par exemple, il serait intéressant de définir le poids de chacun des quatre paramètres (température, consommation de CODB, contamination bactérienne et résiduel de chlore), pour affiner le calcul de risque. D'autre part, le risque moyen sur le réseau, qui est calculé à partir d'une moyenne, dépend du choix de la position des sites contrôlés. En conséquence, les points de prélèvement doivent être les plus représentatifs possible du réseau étudié (points de prélèvement proches, à distance intermédiaire ou éloignés de l'usine de traitement) et identiques lorsque les campagnes d'étude sont répétées d'une année à l'autre sur un même réseau. Il serait envisageable d'établir une zonation du réseau de distribution en fonction du niveau d'exposition des différents sites contrôlés et de définir les actions types à envisager dans chaque zone. Enfin, il est impératif de combiner les mesures de risque avec les vitesses de circulation de l'eau dans les canalisations.

- La technique de mesure du CODB mettant en oeuvre un inoculum de bactéries fixées sur du sable autorise un suivi de l'efficacité des filières de traitement vis-à-vis de l'élimination de la matière organique biodégradable, et de l'évolution de celle-ci au cours de la distribution. Cependant la durée du test (environ une semaine) rend impossible toute prévision de la qualité finale de l'eau produite et de son devenir dans le réseau (seul un bilan a posteriori est réalisé). Une nouvelle technique de mesure du CODB, utilisant également une flore bactérienne fixée, permet d'obtenir un résultat en quelques heures: la valeur de CODB correspond à la différence de concentration de COD dans un échantillon d'eau avant et après son passage dans un réacteur biologique (constitué de deux colonnes remplies d'un support colonisé par des bactéries) (Figure 2). L'automatisation de cette méthode, en rendant possible la mesure en continu du CODB dans l'eau de rivière et lors des différentes étapes du traitement, permettrait d'affiner les différentes étapes de traitements en fonction de la qualité initiale de l'eau, de prévoir la qualité de l'eau produite, d'ajuster les doses de chlore pour limiter la recroissance bactérienne et de déterminer la part de MOB consommée le long du réseau.

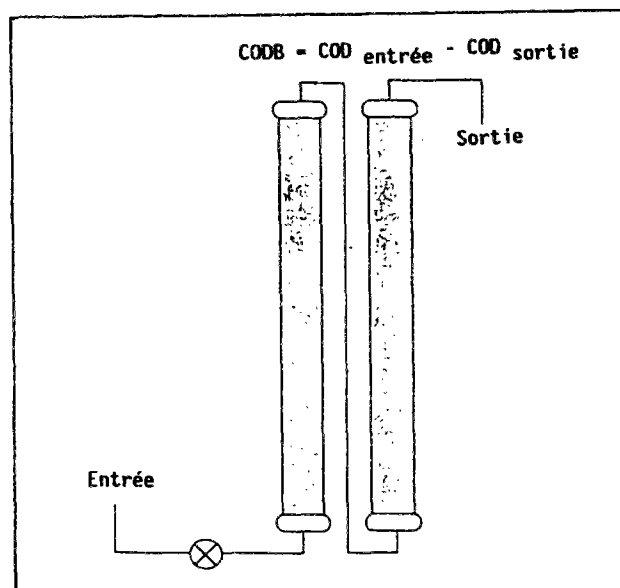


Figure 2: Schéma du bioréacteur utilisé pour la détermination rapide du CODB.

- Par ailleurs, la détermination du CODB à l'aide d'un inoculum fixé sur du sable fournit une mesure globale de la MOB et ne permet donc pas d'identifier les molécules réellement responsables de la recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution. Lors d'une étude que nous avons réalisée au Stroud Water Research Center (Philadelphie), nous avons utilisé le dispositif décrit ci-dessus (Figure 2) pour effectuer des analyses de COD, d'hydrates de carbone, d'acides aminés et de substances humiques ont été réalisés sur des échantillons d'eau en entrée et en sortie de bioréacteur. Ceci nous a permis de préciser la composition chimique du COD et du CODB d'échantillons d'eau de surface. Dans le cas d'un échantillon d'eau de rivière (COD = 4,34 mg/l), la figure 3 montre que le COD était constitué majoritairement par des substances humiques (71%), et par des hydrates de carbone (16%, dont la moitié était combinée à des matières humiques).

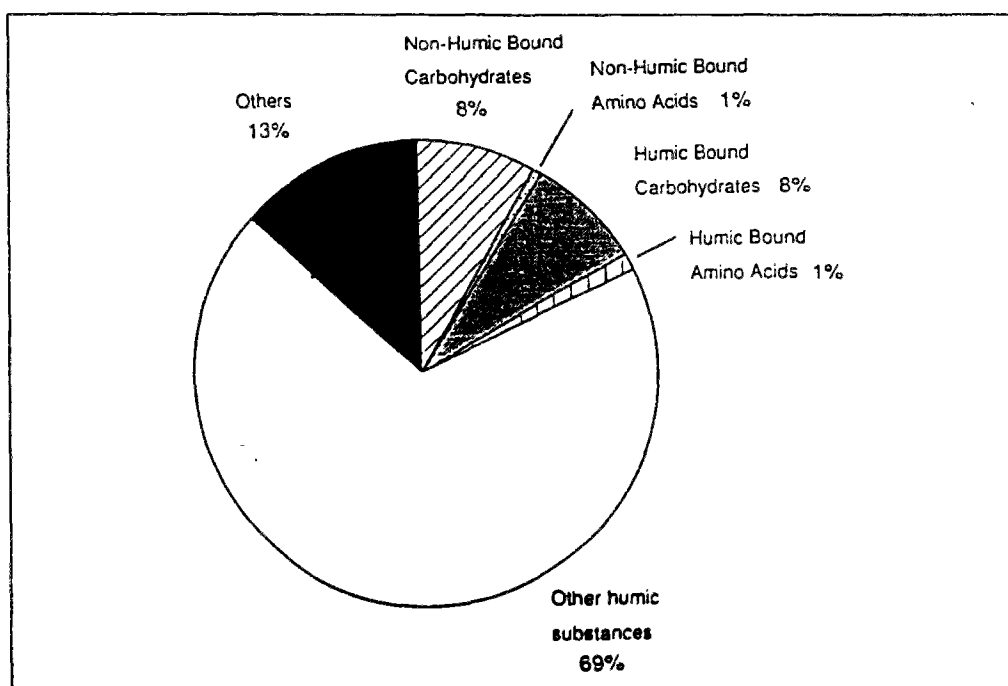


Figure 3: Composition chimique du COD d'un échantillon d'eau de rivière.

Vingt pour cent des substances humiques ont été biodégradées, elles ont représenté 51% du CODB (Figure 4). Les hydrates de carbone (dont plus de la moitié liée aux substances humiques ont représenté 41 % du CODB. Les acides aminés (3%) sont des constituants minoritaires du CODB. Ces résultats remettent en question l'idée très répandue selon laquelle les substances humiques seraient très difficilement biodégradables.

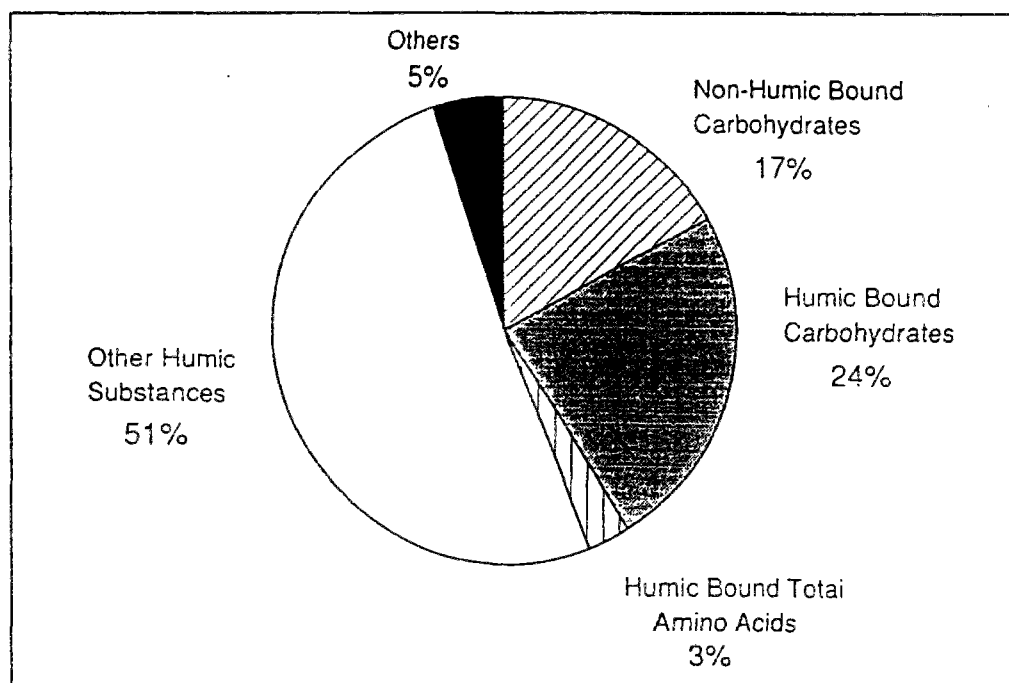


Figure 4: Composition chimique du CODB d'un échantillon d'eau de rivière.

Des études complémentaires sont indispensables pour définir plus précisément la nature chimique des constituants biodégradables, ainsi que leur cinétique de biodégradation afin de les éliminer en totalité lors des différents traitements.

*Il est indiscutable que la production d'une eau à faible teneur en matière organique biodégradable est la solution d'avenir pour obtenir une eau biologiquement stable et éviter la surchloration (contraire à l'assurance d'une eau de qualité). Ces objectifs seront peut-être atteints par une réelle optimisation des filières biologiques qui devront être complétées par de nouveaux procédés de traitement (ozone catalytique, nanofiltration...)*